



ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2018/19

DOCTORANDO: **BOSCH MENDOZA, PEDRO EMILIO**

D.N.I./PASAPORTE: ****5631H

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D424-QUÍMICA MÉDICA**

DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: **QUÍMICA ORGÁNICA Y QUÍMICA INORGÁNICA**

TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 14/12/18, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **JUAN JOSÉ VAQUERO LÓPEZ // DAVID SUCUNZA SÁEZ**.

Sobre el siguiente tema: *NUEVOS FLUORÓFOROS CATIÓNICOS INTERCALANTES DE ADN COMO POTENCIALES SONDAS PARA ESTA BIOMOLÉCULA*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL¹ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): **SOBRESALIENTE**

Alcalá de Henares, 14 de DICIEMBRE de 2018

EL PRESIDENTE

Fdo.: MARIA ANGELES CASTRO GONZÁLEZ

EL SECRETARIO

Fdo.: ALBERTO DOMINGO GALÁN

EL VOCAL

Fdo.: DIEGO SAMPEDRO RUIZ

Con fecha 21 de enero de 2019 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- ☒ Conceder la Mención de "Cum Laude"
☐ No conceder la Mención de "Cum Laude"

FIRMA DEL ALUMNO,

Fdo.: BOSCH MENDOZA, PEDRO EMILIO

La Secretaria de la Comisión Delegada

¹ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:



En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 21 de enero, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *BOSCH MENDOZA, PEDRO EMILIO*, el día 14 de diciembre de 2018, titulada *NUEVOS FLUORÓFOROS CATIÓNICOS INTERCALANTES DE ADN COMO POTENCIALES SONDAS PARA ESTA BIOMOLÉCULA*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 22 de enero de 2019
EL VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA



F. Javier de la Mata

F. Javier de la Mata de la Mata

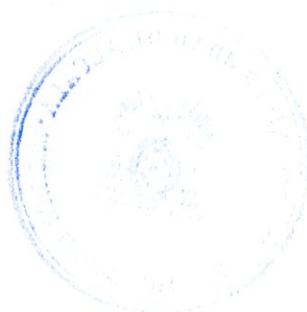
Copia por e-mail a:

Doctorando: BOSCH MENDOZA, PEDRO EMILIO

Secretario del Tribunal: ALBERTO DOMINGO GALÁN

Directores de Tesis: JUAN JOSÉ VAQUERO LÓPEZ // DAVID SUCUNZA SÁEZ

18th February 1900





Universidad
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO.

Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a PEDRO EMILIO BOSCH MENDOZA
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: ☒ soporte electrónico ☐ impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el n^o de páginas: 311 se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a 17 de OCTUBRE de 2018



Aurora Juárez Abril

Fdo. El Funcionario

RESTAURAR

IMPRIMIR



Programa de Doctorado en Química Médica

**Nuevos fluoróforos catiónicos
intercalantes de ADN como
potenciales sondas para esta
biomolécula**

Tesis doctoral presentada por

Pedro E. Bosch Mendoza

Directores: Prof. Dr. Juan José Vaquero López
Dr. David Sucunza Sáenz

Alcalá de Henares, 2018



Programa de Doctorado en Química Médica

**Nuevos fluoróforos catiónicos
intercalantes de ADN como
potenciales sondas para esta
biomolécula**

Tesis doctoral presentada por

Pedro E. Bosch Mendoza

Directores: Prof. Dr. Juan José Vaquero López
Dr. David Sucunza Sáenz

Alcalá de Henares, 2018



DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA ORGÁNICA Y QUÍMICA
INORGÁNICA
Edificio de Farmacia – Campus Universitario
Carretera Madrid-Barcelona, km 33,600
28805 Alcalá de Henares (Madrid)
dpto.quimorinor@uah.es

El **Prof. Dr. Julio Álvarez-Builla Gómez**, Catedrático de Universidad y Coordinador del programa de doctorado en Química Médica de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA: Que **D. Pedro E. Bosch Mendoza**, Licenciado en Farmacia por la Universidad de Alcalá, ha realizado en el Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá bajo la dirección del **Prof. Dr. Juan José Vaquero López** y del **Dr. David Sucunza Sáenz** el trabajo experimental recogido en la presente Memoria y titulado:

Nuevos fluoróforos catiónicos intercalantes de ADN como potenciales sondas para esta biomolécula

y autoriza su presentación para optar al grado de Doctor en Química Médica por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, firma el presente certificado.

Alcalá de Henares, Octubre de 2018

JULIO ALVAREZ-BUILLA GOMEZ
DPTO. QUIMICA - ORGANICA
UNIVERSIDAD ALCALA DE HENARES
MADRID - ESPAÑA

Fdo. Julio Álvarez-Builla Gómez



Universidad
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA ORGÁNICA Y QUÍMICA
INORGÁNICA

Edificio de Farmacia – Campus Universitario

Carretera Madrid-Barcelona, km 33,600

28805 Alcalá de Henares (Madrid)

dpto.quimorinor@uah.es

Los abajo firmantes, **Dr. David Sucunza Sáenz**, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá y **Prof. Dr. Juan José Vaquero López**, Catedrático del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICAN: Que la Memoria presentada por **D. Pedro E. Bosch Mendoza**, con el título:

Nuevos fluoróforos catiónicos intercalantes de ADN como potenciales sondas para esta biomolécula

ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá, y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor en Química Médica por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, firman el presente certificado.

Alcalá de Henares, Octubre de 2018

Fdo. Juan José Vaquero López

Fdo. David Sucunza Sáenz

Una tesis doctoral es un proceso colectivo, largo, y muchas veces ingrato, sujeto, por lo general, a los vaivenes provocados por los resultados obtenidos en los experimentos realizados. Es un proceso lleno de interrogantes, no solo científicos, también personales. Es un viaje el cual nos permite aprender de lo que nos rodea mientras aprendemos sobre lo que llevamos dentro. Nos vemos inmersos en una auténtica montaña rusa de emociones, donde los buenos resultados se celebran como la mayor victoria de la historia y muchas veces los resultados negativos son percibidos como golpes devastadores para nuestra, ya frágil, autoestima. Sin embargo, somos capaces de encajarlos con una palabra, una idea, o una simple mirada de aquellos que son partícipes de este viaje, de aquellos faros en la noche, que con su luz nos han guiado a puertos mejores. Por ello me gustaría agradecer a todas esas luces siempre cálidas que han contribuido de un modo u otro a que esta travesía llegue a su destino, a completar esta tesis.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis, al Prof. Juan José Vaquero, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y ayudarme cada vez que ha sido necesario y al Dr. David Sucunza por el día a día en el laboratorio, por sufrirme, aconsejarme y guiarme en todo momento. A ambos me gustaría agradecerles también la confianza depositada en mí durante estos años de tesis así como la comprensión en los momentos más difíciles.

Quiero agradecer, por la inestimable ayuda en la consecución de esta tesis, al Dr. Alberto Domingo por la ayuda en los estudios con células vivas y al Prof. Francisco Mendicuti, por los estudios químico físicos y computacionales.

Quiero agradecer también al Prof. Julio Alvarez-Builla y a los demás profesores del departamento por las ideas y los consejos aportados, así como el interés mostrado en las reuniones de grupo en especial a las Dras. Carolina Burgos, Ana M^a Cuadro, M^a Luisa Izquierdo y Patricia García García y a los Dres. Ramón Alajarín, Manuel Ángel Fernández Rodríguez y José L. Aceña

Hago extensivo mi agradecimiento a la Universidad de Alcalá por la beca predoctoral concedida para la realización de esta tesis.

A Eugenia y Desi, los técnicos de laboratorio, Gloria, la secretaria del departamento, y a los técnicos de RMN y E. Masas, el Dr. Antonio Salgado, el Dr. Mijail Galakhov y José M^a Arribas, por su ayuda en la determinación estructural de algunos compuestos.

Quiero hacer un agradecimiento especial a la Dra. María Cano y la Dra. Ana José Moreno del grupo de investigación del Prof. Antonio García García por avivar la chispa, por alimentar mi entusiasmo por la ciencia y la investigación durante la realización del Máster en Investigación Farmacológica impartido por la Universidad Autónoma de Madrid. Así mismo, agradecer a los miembros del CCF-ITH en especial a la Dra. Rocío Lajarín y al Dr. Cristóbal de los Ríos por esas charlas, regadas de cerveza, sobre química orgánica, farmacología y lo que se terciase. Sobre todo quiero agradecer al Dr. Javier Gutiérrez por todos esos conciertos, barbacoas, risas y anécdotas cosechadas desde que empezamos la carrera.

En este apartado no podían faltar aquellos con los que he compartido estos años, aquellos que han vivido en primera persona a pie de vitrina algunos éxitos y muchos resultados no deseados (bonita manera de hablar de fracasos). Quiero agradecer de manera infinita a mis compañeros de laboratorio, sin ellos el doctorado habría sido bastante más frío y con menos color. A Idoia Urriza y a Juan Moralejo por los buenos momentos en los primeros compases del doctorado. A las Dras. Elena Nieto, Patricia Sánchez, Anna Coppola, Fabiana Filace y al Dr. Gonzalo García por sus inestimables consejos, por haberme enseñado tanto. Al Dr. Thais Carmona, por esos momentos en quifi, por esas ideas cuando no parecía que supiésemos lo que estaba ocurriendo y por proporcionarme esa mínima soltura que conseguí en un laboratorio de química física. A Raúl por tantas risas y comentarios políticamente incorrectos, por esos juegos de mesa, y discusiones sobre cualquier cosa de frikis. A Ana y Marisol, por aguantarme, no ha sido fácil ¿eh? Pero nos hemos reído y mucho; y nos seguiremos riendo que para llorar ya tenemos rendimientos del 15%. A María, “La inorgánica”, por los viajes y las comilonas. A Ester, hemos pasado poco tiempo juntos en el labo, deseo que las cosas te vayan bien y ánimo que cada vez queda menos.

A Sara la siamesa y a Alber, chicos, no tenéis ni idea de lo bien que me habéis hecho, de lo que me habéis ayudado y de todo lo que me habéis dado, por esto daros las gracias nunca será suficiente, no os voy a echar de menos, porque no hará falta, espero no alejarme demasiado. Os quiero mucho.

Quiero agradecer también a los chicos de TF algo, habéis sacado resultados y me habéis enseñado, por lo general, más de lo que os he podido enseñar yo. Me habéis hecho ver cosas sobre mí y me habéis hecho mejorar. Especialmente quiero agradecer a Alberto Valero por ser una enciclopedia y refrescarme tantas cosas al principio, a Juanito por esos fresquitos, a Mario, a Vanesa y a Irene por mejorar el ambiente del labo un 200%, gracias por ser un apoyo, gracias por esas palmaditas en la espalda cuando más se necesitaban.

Quiero mencionar y dar las gracias a la gente que ha compartido esta etapa fuera del laboratorio. Gracias a Carmen por haberme apoyado hasta la extenuación. A la gente del Roco de la UAH porque habéis sido la válvula de escape perfecta, sobre todo a Grana, Rober, Bernie y Fran, mi compi de cordada si es que usásemos la cuerda. A Jess, Miguel, Juli, Torralbo, Aino, Irene Valle, Cris Navarro, Víctor, Andrea, Marisol y Helena por algunas noches borrosas y muchas risas. Y a David, Fran y Juan, por *“all is violet”*, ese grupillo que no llegó a prosperar pero que nos aportó horas de distorsión, ruido y cañas.

A mi familia, esos sufridores en la sombra, habéis sabido lidiar con mi carácter, con mis momentos de estrés y de tristeza. Gracias a mi padre y a Diego, no me habéis dado la espalda nunca, aunque lo mereciese, y ahí estáis. No lo digo mucho pero os quiero y como digo, estoy agradecido por estar en vuestras vidas aunque haya distancia.

Pero sobretodo quiero agradecer a mamá, esa luchadora, tormenta y refugio, la palabra justa en el momento justo, el ideal de virtud propuesto por Aristóteles. Dicen que el amor de una madre no es cuantificable y en efecto, para mí ha sido infinito, capaz de trascender dimensiones, la única constante en la incertidumbre. Gracias por estos años, gracias por la vida, gracias por haberme animado a no rendirme nunca. Viste como empezó este viaje y donde quiera que estés sé que lo estás viendo acabar, y sé que estas orgullosa. Esta tesis va para ti. Siempre.

A mi madre

Glosario de abreviaturas y acrónimos

^1H RMN: Resonancia magnética nuclear de protón

^{13}C RMN: Resonancia magnética nuclear de carbono

Φ_f : Rendimiento cuántico de fluorescencia

$^{\circ}\text{C}$: Grado centígrado

A: Adenina

Å: Angström

Ac: Acilo

Ar: Arilo

Ar: Argón

Atm: Atmósfera

AZAH: *Azonia aromatic heterocycles*

AZT: Azidotimidina o Zidovudina

Boc: *t*-butiloxicarbonil

Bu: Butilo

C: Concentración

C: Citosina

Calcd: Calculado

CD: Dicroísmo circular

cm: Centímetro

col: Colaboradores

ct-ADN: ADN de timo bovino

d: Deuterado

d: doblete

δ : Desplazamiento químico en ppm

Δ : Calentamiento a reflujo

Δ : Incremento

DAPI: 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida

DCE: Dicloroetano

DME: Dimetoxietano

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DODO: 1,4-dioxano-2,3-diol

DPH: O-(difenilfosfinoil)hidroxilamina

dppf: Difenilfosfinoferroceno

ϵ : Absortividad molar

e.g.: *exempli gratia* (latín) por ejemplo

Eq.: Equivalentes

ESI: Ionización por electrospray

Et: etilo

et al.: et alii (latin) Y otros/ y colaboradores

EWG: Grupo electroattractor

FRET: Transferencia de energía por resonancia tipo Förster

G: Guanina

g: Gramos

GEA: Grupo electroattractor

h: Horas

h: Hombro

Het: Heterociclo

HOMO: *Highest occupied molecular orbital*

HOSA: Ácido O-hidroxilaminosulfónico

HRMS: Espectroscopia de masas de alta resolución

Hz: Hercio

I: Intensidad de fluorescencia

ICD: Dicroísmo circular inducido

IR: Infrarrojo

J: Constante de acoplamiento en Hz

K: Grados Kelvin

K: Constante de asociación

Kcal: Kilocaloría

λ : Longitud de onda

λ_{abs} : Longitud de onda máxima de absorción

λ_{em} : Longitud de onda máxima de emisión

λ_{exc} : Longitud de onda de excitación

λ : Paso óptico

LD₅₀: Dosis letal 50

LUMO: *Lowest unoccupied molecular orbital*

μM : Micromolar

m -: Sustituyente en posición *meta*

m: Multiplete

M: Molaridad

MBE: Estructura de mínima energía de unión

MD: Dinámica molecular

Me: Metilo

Mes: Mesilo

mg: Miligramos

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mmol: Milimoles

M.p.: Punto de fusión

ms: Milisegundo

MS: Espectroscopia de masas

MSH: *O*-hidroxilaminomesetilensulfonato

MSTS: Mesetilensulfonato

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

m/z: Relación masa/carga

n: número de pares de base libres por par de bases complejada

NBS: *N*-bromosuccinimida

NIS: *N*-iodosuccinimida

nm: Nanómetro

ns: nanosegundo

o-: Sustituyente en posición *orto*

π^* : π antienlazante

p-: Sustituyente en posición *para*

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDB: *Protein data bank*

PET: Transferencia de electrones fotoinducida

P.e.: Por ejemplo

Ph: Fenilo

ppm: Partes por millón

q: Cuadruplete

r: Anisotropía de fluorescencia

R: Sustituyente

Rdto.: Rendimiento

RE: Retículo endoplásmico

RNA: Ácido ribonucleico

r.t.: Temperatura ambiente

s: Singlete

Sat.: Saturado

t: Tert

t: Triplete

t: Tiempo

T: Timina

T/Temp: Temperatura

TLC: Cromatografía en capa fina

T_m: Temperatura de desnaturalización (*melting*)

τ: Tiempo de vida media de fluorescencia

t.a.: Temperatura ambiente

THF: Tetrahidrofurano

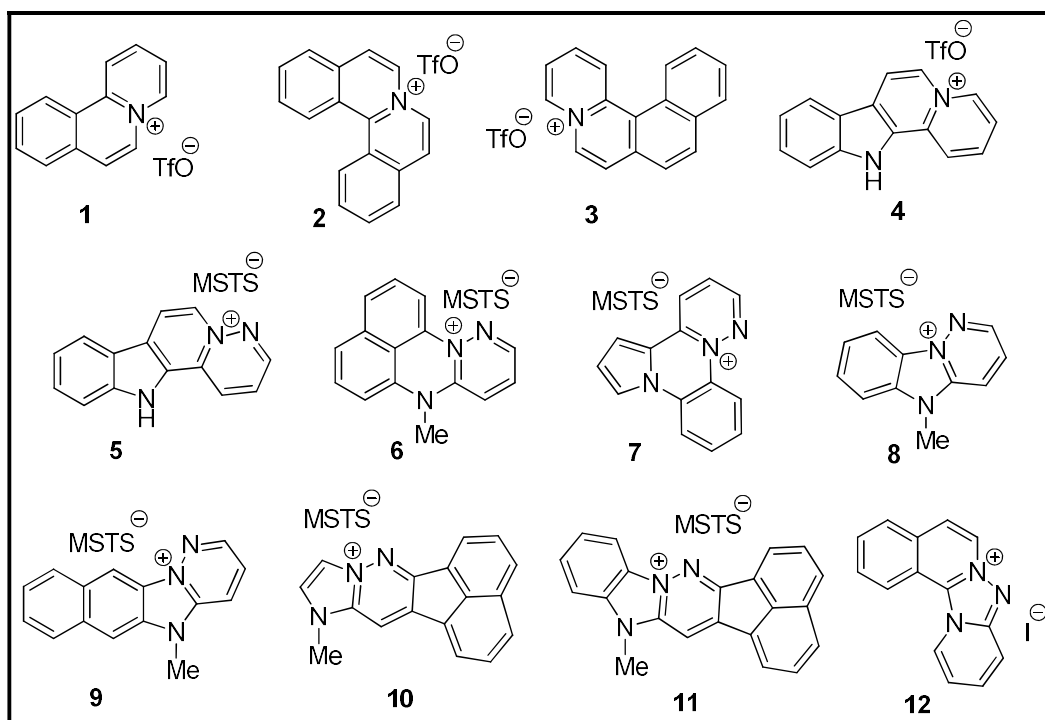
Ts: Tosilo

U: Uracilo

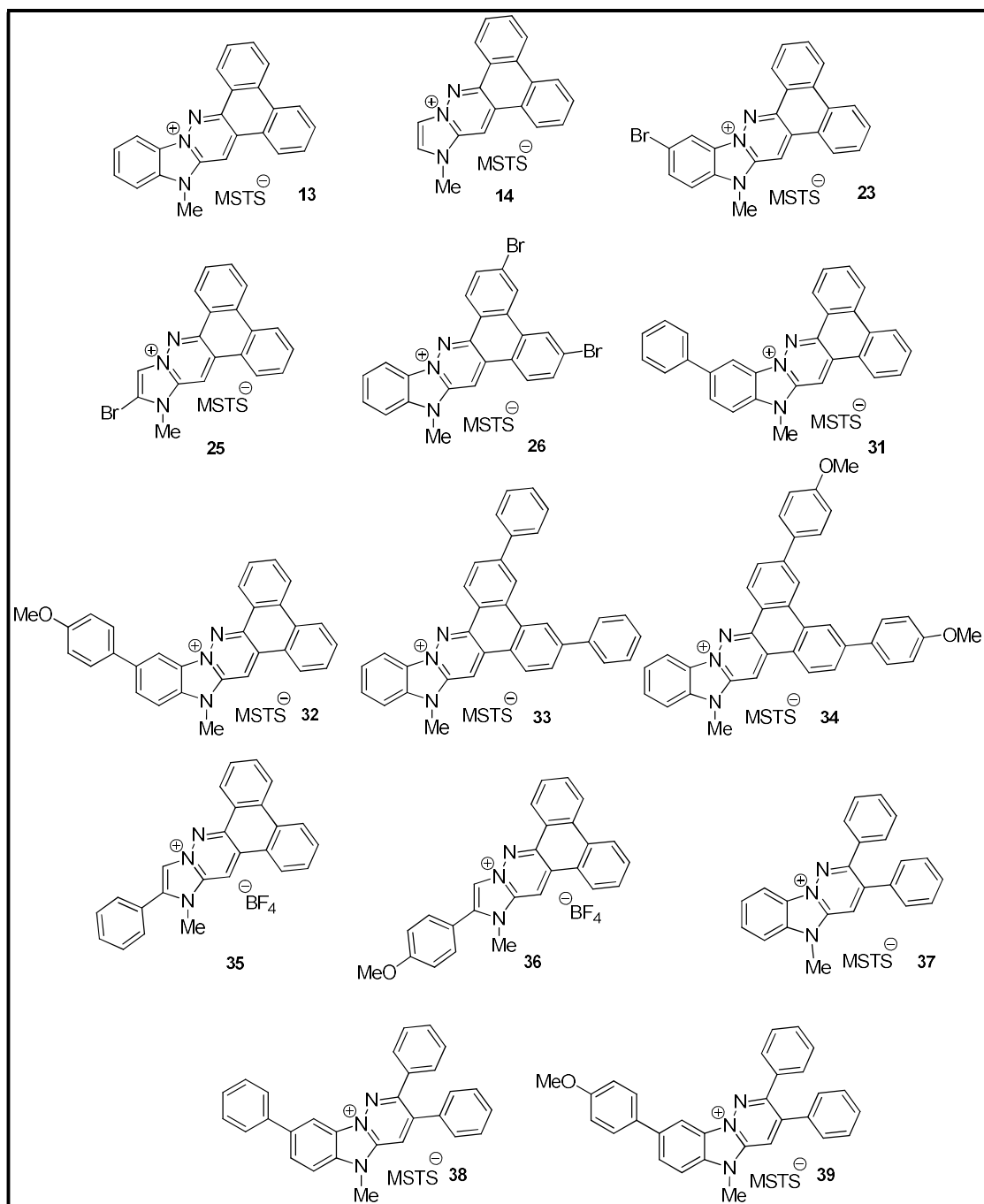
UV-Vis: Ultravioleta-Visible

Glosario de estructuras

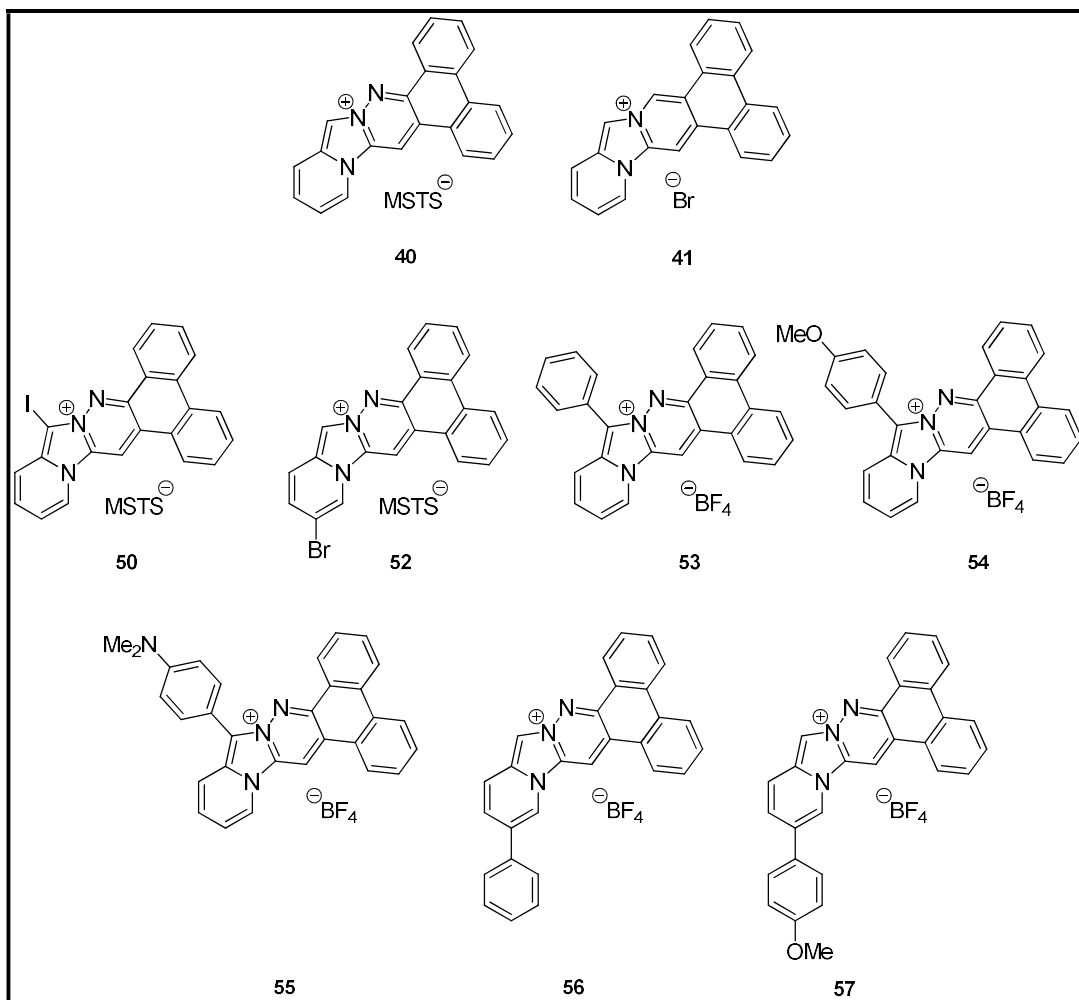
1. Estudio comparativo de interacción con el ADN de diversos cationes tipo *azonia*



2. Estudio de cationes derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio



3. Estudio de cationes derivados de piridoimidazopiridazinio



Índice

Introducción y objetivos

Antecedentes

1. ADN

- 1.1. Estructura secundaria del ADN
- 1.2. ADN como diana de unión
- 1.3. Modos de unión de ligandos al ADN
 - 1.3.1. Unión covalente
 - 1.3.2. Unión no covalente
 - 1.3.2.1. Unión al surco
 - 1.3.2.2. Intercalación
 - 1.3.2.3. Unión mixta
 - 1.4. Intercalación
 - 1.4.1. Poliintercalación
 - 1.4.2. Acridinas
 - 1.4.3. Antraquinonas
 - 1.4.4. Colorantes de cianina
 - 1.4.5. Iones fenantridinio
 - 1.4.6. Intercalantes catiónicos tipo azonia
 - 1.4.6.1. Derivados de quinolizinio
 - 1.4.6.2. Derivados catiónicos tipo azonia no benzenoides
 - 1.4.6.2.1. Derivados de carbolina
 - 1.4.6.2.2. Derivados de azolodiazina
 - 1.4.6.2.3. Derivados de benzimidazol, piridoimidazol, benzotiazol
- 1.5. Ligandos que aumentan su fluorescencia tras intercalación (light-up probes)

2. Procesos fotofísicos

- 2.1. Procesos asociados a la luz
 - 2.1.1. Procesos de absorción
 - 2.1.2. Procesos de desactivación unimoleculares
 - 2.1.2.1. Procesos no radiantes
 - 2.1.2.2. Procesos radiantes

-
- 2.1.3. Procesos de desactivación bimoleculares
 - 2.1.3.1. Desactivación o quenching
 - 2.1.3.2. Transferencia de energía electrónica
 - 2.2. Aplicación de fenómenos de absorción a ligandos
 - 2.2.1. Dicroísmo circular
 - 2.2.2. Fundamentos teóricos del Dicroísmo Circular
 - 2.2.3. Dicroísmo circular aplicado a complejos Ligando/ADN

3. Síntesis de cationes heteroaromáticos tipo azonia

- 3.1. Reacciones de formación de anillo basadas en la activación de enlaces C-H
 - 3.1.1. Activación C(sp²)-H
 - 3.1.2. Activación C(sp³)-H
- 3.2. Reacciones de metátesis de cierre de anillo
 - 3.2.1. Síntesis de quinolizínios
 - 3.2.2. Síntesis de benzoquinolizínios
 - 3.2.3. Síntesis de dibenzo- y naftoquinolizínios
- 3.3. Condensación de Westphal
 - 3.3.1. Síntesis de sales de azinio y azolio
 - 3.3.2. Tipos de condensaciones de Westphal en función del sustrato
 - 3.3.2.1. Condensación tipo C-C
 - 3.3.2.1.1. Condensación C-C con sales de azinio
 - 3.3.2.1.2. Condensación C-C con sales de azolio
 - 3.3.2.2. Condensación tipo N-C
 - 3.3.2.2.1. Condensación N-C con sales de azinio
 - 3.3.2.2.2. Condensación N-C con sales de azolio
 - 3.3.2.3. Condensación tipo N-N
 - 3.3.2.4. Condensación N-N con sales de azinio
 - 3.3.3. Regioselectividad en la condensación de Westphal
 - 3.3.4. Condensación de Westphal en fase sólida
 - 3.3.5. Condensación de Westphal intramolecular

Discusión de resultados

1. Ampliación de la quimioteca de cationes heteroaromáticos tipo *azonia*

- 1.1. Síntesis de cationes tipo *azonia*
- 1.2. Síntesis de cationes derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio

1.3. Síntesis de cationes derivados de piridoimidazopiridazinio

1.3.1. Cationes dibenzopiridoimidazocinolinio no sustituidos

1.3.2. Cationes dibenzopiridoimidazocinolinio sustituidos

2. Curvas de desnaturalización de ADN

3. Caracterización fotofísica

3.1. Quimioteca de cationes tipo *azonia*

3.2. Cationes derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio

3.3. Cationes derivados de piridoimidazopiridazinio

3.3.1. Derivados de dibenzoimidazocinolinio no sustituidos

3.3.2. Derivados de dibenzoimidazocinolinio sustituidos

4. Estudios de unión con ADN de timo bovino

4.1. Cationes heteroaromáticos tipo *azonia* **4, 8 y 11**

4.1.1. Valoración de fluorescencia con ADN de timo bovino

4.1.2. Tiempos de vida media en presencia de ADN de timo bovino

4.1.3. Dicroísmo circular

4.2. Cationes derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio

4.2.1. Valoración de fluorescencia con ADN de timo bovino

4.2.2. Dicroísmo circular

4.3. Cationes derivados de piridoimidazopiridazinio no sustituidos

4.3.1. Valoraciones de fluorescencia de derivados no sustituidos de piridoimidazopiridazinio con ADN de timo bovino

4.3.2. Medidas de tiempo de vida media en presencia de ADN de timo bovino

4.3.3. Dicroísmo circular

4.4. Cationes derivados de piridoimidazopiridazinio sustituidos

4.4.1. Valoración de fluorescencia de derivados sustituidos de piridoimidazopiridazinio con ADN de timo bovino

4.4.2. Tiempos de vida media en presencia de ADN de timo bovino

4.4.3. Dicroísmo circular

5. Mecánica y dinámica molecular

5.1. Estudio de los ligandos **4 y 11**

5.2. Estudio de los ligandos **40 y 41**

5.3. Estudio de los ligandos **53 y 56**

6. Estudios en células vivas

6.1. Actividad antiproliferativa: ensayo de MTT

6.2. Tinción celular. Microscopía confocal

Conclusiones

Materiales y métodos

1. Procedimientos experimentales

1.1. Información general

1.2. Caracterización fotofísica del ligando

1.2.1. Obtención del máximo de absorción y absorptividad molar

1.2.2. Obtención del máximo de emisión y eficiencia cuántica

1.3. Estudios de unión de Ligando-ADN

1.3.1. Valoraciones espectrofluorimétricas con ADN para la obtención de las constantes de asociación

1.3.2. Obtención de perfiles de decaimiento y tiempos de vida media

1.3.3. Medidas de dicroísmo circular

1.3.4. Mecánica y dinámica molecular

1.4. Estudios en células vivas

Parte experimental

Bibliografía

Introducción y objetivos

Las moléculas policíclicas aromáticas son capaces de interactuar con la doble hebra de ADN,¹⁻⁵ especialmente si poseen núcleos cargados o deficiencia electrónica en su estructura. Este fenómeno resulta interesante en el campo de la química médica, tanto desde el punto de vista del tratamiento teórico de las interacciones ADN-ligando como desde la potencialidad de esta interacción para producir cambios significativos en la estructura y función de la biomolécula⁶⁻¹⁰ tras la formación de un complejo entre el ADN y el ligando. Estos efectos son los esperados en los fármacos cuya diana es el ADN y, por lo tanto, la intercalación de moléculas pequeñas en ADN puede encontrar aplicación en aproximaciones terapéuticas donde se busque suprimir la replicación o transcripción de genes a la hora de destruir células tumorales o atacar tejidos infectados, es decir, actuar como agentes quimioterápicos.¹¹

La unión de estas moléculas al ADN se caracteriza por su inserción planar entre dos pares de bases, lo que permite interacciones de apilamiento π entre esta biomolécula y el compuesto intercalante. Se ha establecido que la presencia de una carga positiva en el compuesto intercalante mejora su capacidad para unirse al ADN debido a interacciones atractivas de tipo iónico entre el catión y el esqueleto fosfato del ADN.¹²

En la gran mayoría de los compuestos intercalantes catiónicos, la carga positiva se consigue mediante: a) La presencia de un grupo amonio exocíclico; b) Un fragmento tipo azinio o azolio (por lo general cuaternizados por alquilación o protonación, por lo que con frecuencia sus propiedades de unión al ADN son susceptibles a cambios del pH)³; c) Un heterociclo que presente un nitrógeno cuaternario en posición cabeza de puente (en este caso los posibles ligandos de ADN se verían menos afectados por los cambios en el pH del medio).³

El núcleo quinolizinio es el más sencillo de los cationes denominados tipo *azonia*,^{13, 14} esto es, compuestos policíclicos aromáticos con un nitrógeno cuaternario en posición cabeza de puente. El sistema de quinolizinio -y sus formas dihidro y tetrahidro- se encuentra presente en varias familias de alcaloides,¹⁵ entre las que destacan las berberinas y otros como coralina, sempervirina, flavopereirina, neooxigambirtanina, afrocurarina y flavocarpina. Algunos de estos alcaloides pueden existir en medio ácido y neutro como cationes y en medio alcalino en sus formas dipolares o heterobetaínicas. Recientemente, se ha atribuido a estos compuestos propiedades anticancerígenas como intercalantes de ADN,¹⁶ inmunoestimulantes,¹⁷ anti-VIH,¹⁶ sedantes y antipsicóticas.¹⁸

Las protoberberinas incorporan la forma dihidro del quinolizinio, presentando una estructura básica de 5,6-dihidrobenzo[*a,g*]quinolizinio que, por lo general, tiene como contraión un

anión cloruro o un carboxilato de un ácido orgánico. Las protoberberinas han mostrado actividad como analgésicos, antisépticos y sedantes en la medicina tradicional china,¹⁹ siendo la berberina, que también presenta numerosas aplicaciones farmacológicas,²⁰ uno de los alcaloides más distribuidos en el reino vegetal, ya que ha sido encontrado en nueve familias botánicas.²¹

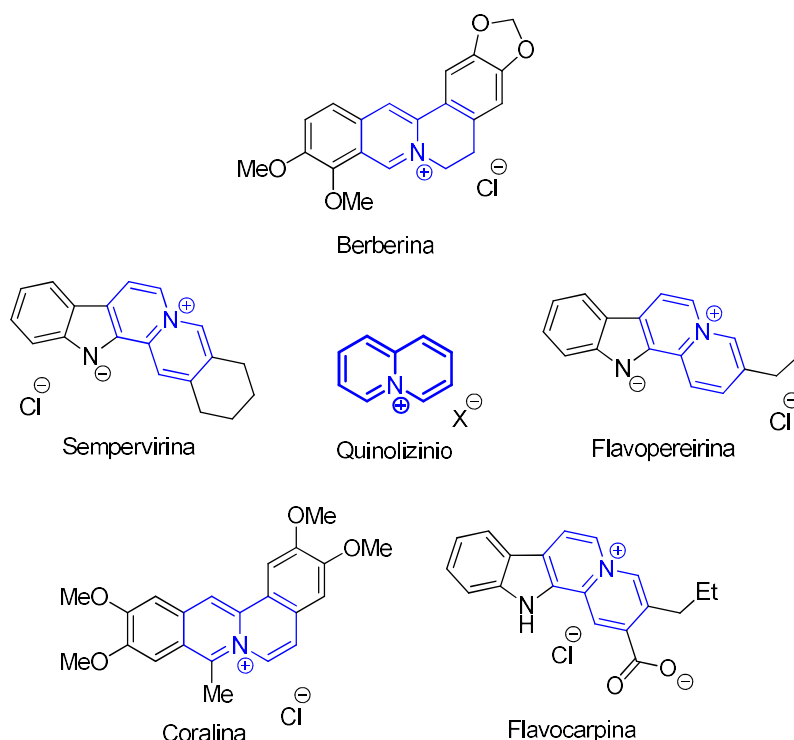


Figura 1. Quinolizinio y alcaloides con nitrógeno cuaternario en posición cabeza de puente

A la familia de las protoberberinas pertenece también la coralina, que fue el primer compuesto con núcleo de quinolizinio descrito.²² La coralina³ presenta una alta afinidad por el ADN, al que se une mediante intercalación no cooperativa. Además, también se ha observado que tiene una gran afinidad por las estructuras triple y cuádruple de ADN.²³ Tanto este alcaloide como sus análogos sintéticos, algunos de los cuales poseen actividades antimicrobiana y antitumoral,²⁴ se unen al ADN mediante intercalación.

Desde 1988,²⁵ se han realizado numerosos estudios que demuestran el potencial de los cationes heteroaromáticos basados en el núcleo de quinolizinio para interactuar con el ADN y

como el tamaño, la forma y la distribución de electrones en el sistema π de los mismos determina la afinidad que tendrán por la molécula de ADN.²⁶ Por tanto, el sistema de quinolizinio es una estructura prometedora como núcleo básico de moléculas cargadas capaces de unirse al ADN por un mecanismo de intercalación y de su aplicación en química médica como potenciales agentes antiproliferativos.

La mayoría de los derivados de quinolizinio son fluorescentes. De hecho, su estructura electrónica básica está muy relacionada con la de las cianinas, una clase de colorantes sintéticos que ha sido ampliamente empleada en numerosas áreas tales como la óptica no lineal (NLO) o el fotocromismo.²⁷ Sin embargo, el número de sondas altamente fluorescentes de la familia de la cianina es bajo como resultado de procesos no radiantes de desactivación en el estado excitado. En el quinolizinio, en cambio, el esqueleto común a las cianinas se encuentra incorporado dentro de un marco molecular rígido que impide la desactivación no radiativa por cambios conformacionales en la moléculas.²⁸

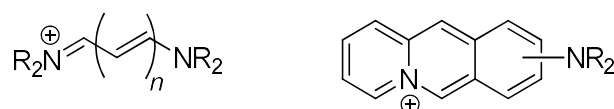


Figura 2. Estructura general de las cianinas (izquierda) y de colorantes basados en quinolizinio (derecha)

La alta fluorescencia mostrada por muchos de los derivados de quinolizinio abre la posibilidad a su uso como sondas fluorescentes. La síntesis de sondas fluorescentes ofrece muchas posibilidades a la hora de obtener moléculas con un patrón de sustitución determinado de cara a la selectividad por un analito concreto. Hay numerosos sensores químicos que permiten la detección fluorimétrica mediante un aumento de la fluorescencia de la sonda al interaccionar con el analito (*light-up probes*).²⁹ Los primeros derivados de quinolizinio, investigados como sondas fluorescentes, estuvieron enfocados a la detección de cambios en el pH³⁰ y la polaridad del disolvente,³¹ pero más tarde se ha explorado la detección de cationes metálicos o biomacromoléculas como ADN o proteínas. La detección de estas biomacromoléculas utilizando sondas fluorescentes se ha convertido en una de las herramientas más versátiles en el campo de química bioanalítica y la biomedicina.³²

Debido a su potencial para intercalar con ADN, los derivados de quinolizinio con al menos tres anillos fusionados son candidatos prometedores como estructuras básicas a la hora de diseñar sondas fluorescentes. Sin embargo, presentan el problema de que, en la mayoría de ejemplos descritos, su intensidad de fluorescencia se ve disminuida tras la intercalación del compuesto

en el ADN, debido a una reacción de transferencia de electrones fotoinducida.^{3,33} A pesar de ello, Ihmels y colaboradores han desarrollado ejemplos de sondas fluorescentes basadas en benzo[*b*]quinolizínios sustituidos con una baja intensidad de fluorescencia intrínseca, las cuales, presentan un aumento en su intensidad de fluorescencia al interactuar con moléculas de ADN.³⁴ Estos compuestos, que son un muy buen ejemplo de sondas *light-up* capaces de intercalar ADN, presentan sustituyentes con libertad de giro que actúan como “interruptores” de la emisión. Estos grupos provocan que el cromóforo no emita fluorescencia en entornos donde estos “interruptores” tengan libertad de giro, ya que estos giros actúan como vías de desactivación no radiante, pero si lo haga cuando el entorno la restrinja, por ejemplo, mediante el proceso de intercalación al ADN, ya que de esta forma se eliminan esas vías no radiantes y se provoca que la desactivación de la molécula se produzca a través de la emisión fluorescente.³⁵

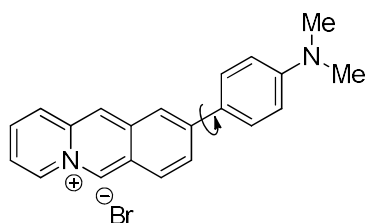


Figura 3. Ejemplo de derivado de acridizinio con sustituyente con libertad de giro.

Alternativamente, existen otros núcleos catiónicos tipo *azonia* que han sido menos estudiados que el quinolizinio pero que se comportan de manera similar. Un ejemplo de ello lo constituyen los derivados de benzotiazolio, benzimidazolio y β -carbolinio, entre otros.

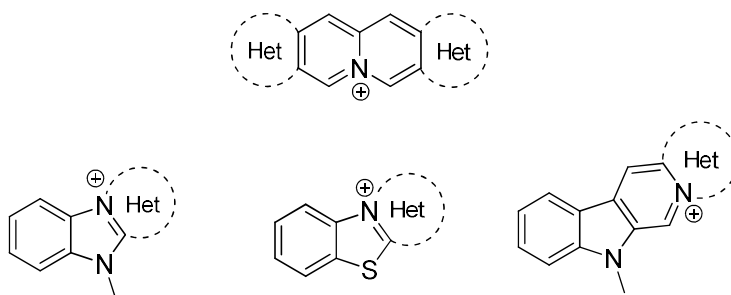


Figura 4. Otros núcleos con potencialidad de ser usados como sondas fluorescentes

La química y aplicaciones de cationes heteroaromáticos tipo *azonia* ha sido una de las líneas de investigación que se han desarrollado en los últimos años en el grupo de investigación *Química Biológica* del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá. Los estudios se iniciaron explorando la reacción de Westphal como método de síntesis de sistemas de quinolizinio y aza-quinolizinio que, posteriormente, se extendieron a otros sistemas policíclicos, al estudio de la regioselectividad de esta reacción, a sus versiones intramolecular y en fase sólida.³⁶⁻⁵⁰

Más recientemente se exploraron los procesos de formación de enlaces C-C catalizados por paladio como un procedimiento idóneo para la funcionalización del sistema quinolizinio y otros relacionados, ya que estos transcurren en condiciones suaves de reacción tanto desde el punto de vista de las temperaturas como del rango de pH empleados. Así, reacciones como Suzuki, Heck, Sonogashira y Stille demostraron ser las más eficaces descritas hasta la fecha para la funcionalización de estos sistemas.⁵¹⁻⁵⁶

Nuestros últimos trabajos se han centrado en el empleo de la reacción de metátesis de cierre de anillo (RCM) en la construcción del sistema de quinolizinio, 1-aza-quinolizinio, benzoquinolizinos, dibenzoquinolizinos y naftoquinolizinos. Un total de 9 sistemas y numerosos derivados de los mismos se han obtenido empleando la reacción de metátesis como paso clave en el proceso de formación del núcleo de quinolizinio, con implicación de distintos enlaces C-C en el proceso de ciclación y con el catalizador de Grubbs II y/o el de Hoveyda-Grubbs produciendo los mejores rendimientos en el proceso de metátesis.⁵⁷⁻⁶³

Las aplicaciones de este tipo de cationes también han sido objeto de las investigaciones del grupo. Se ha realizado un *screening* para la búsqueda de compuestos con buenas propiedades intercalantes de ADN y actividad antiproliferativa, con determinaciones de afinidad, selectividad de secuencia frente a ADN y actividad citotóxica frente a distintos paneles de líneas celulares tumorales. Los resultados obtenidos mostraron cuales debían ser los requisitos básicos estructurales requeridos para la intercalación y se obtuvo un rango de actividades antiproliferativas con valores en el rango μM -nM del IC_{50} . Sin embargo, la mayoría de los compuestos más activos mostraron hepatotoxicidad y este hecho ha limitado hasta el momento su potencial interés en el campo de los antitumorales.^{49, 64}

Resultados más interesantes se han obtenido en relación con su aplicación en el campo de colorantes para tinción celular y, eventualmente, bioimagen. Por una parte sus propiedades fluorescentes asociadas a su capacidad de unión (selectiva en algunos casos) a ADN hacen que

algunos de los compuestos previamente sintetizados en el grupo tengan buen perfil para poder emplearse como sondas de esta biomolécula. Además, el sistema de quinolizinio ha mostrado su interés como unidad aceptora cargada en cromóforos del tipo dador-aceptor (*push-pull*) que presentan comportamiento óptico no lineal (NLO).⁶⁵⁻⁶⁷ Cromóforos con una arquitectura en forma de V del tipo D- π -A⁺- π -D en el que la unidad aceptora (A⁺) es el sistema de quinolizinio han mostrado excelentes propiedades en absorción multifotónica (two photon-absorption, 2PA) tiñendo orgánulos en células HEK.⁶⁸

El trabajo recogido en esta Memoria se ha desarrollado en el contexto de la línea de investigación del grupo orientada a la química y aplicaciones de cationes heteroaromáticos con nitrógeno cuaternario en posición cabeza de puente. El objetivo es la selección de sistemas intercalantes de ADN con estructura tipo *azonia* con capacidad para aumentar su intensidad de fluorescencia tras el proceso de intercalación. La selección se ha basado en el estudio de las propiedades intercalantes y fluorescencia de una quimioteca de cationes tipo *azonia* para identificar los cromóforos básicos que presenten las propiedades más interesantes como potenciales sondas de ADN. Estas propiedades podrían modularse y mejorarse vía sustitución para identificar aquellos derivados que puedan ser candidatos idóneos para ser empleados como sondas fluorescentes de ADN.

En la Figura 5 se detalla la estructura de los cromóforos estudiados, destacando aquellos tres que fueron seleccionados en base a su comportamiento intercalante y aumento de fluorescencia y que están basadas en los núcleos de imidazolio, benzimidazolio e imidazopiridinio.

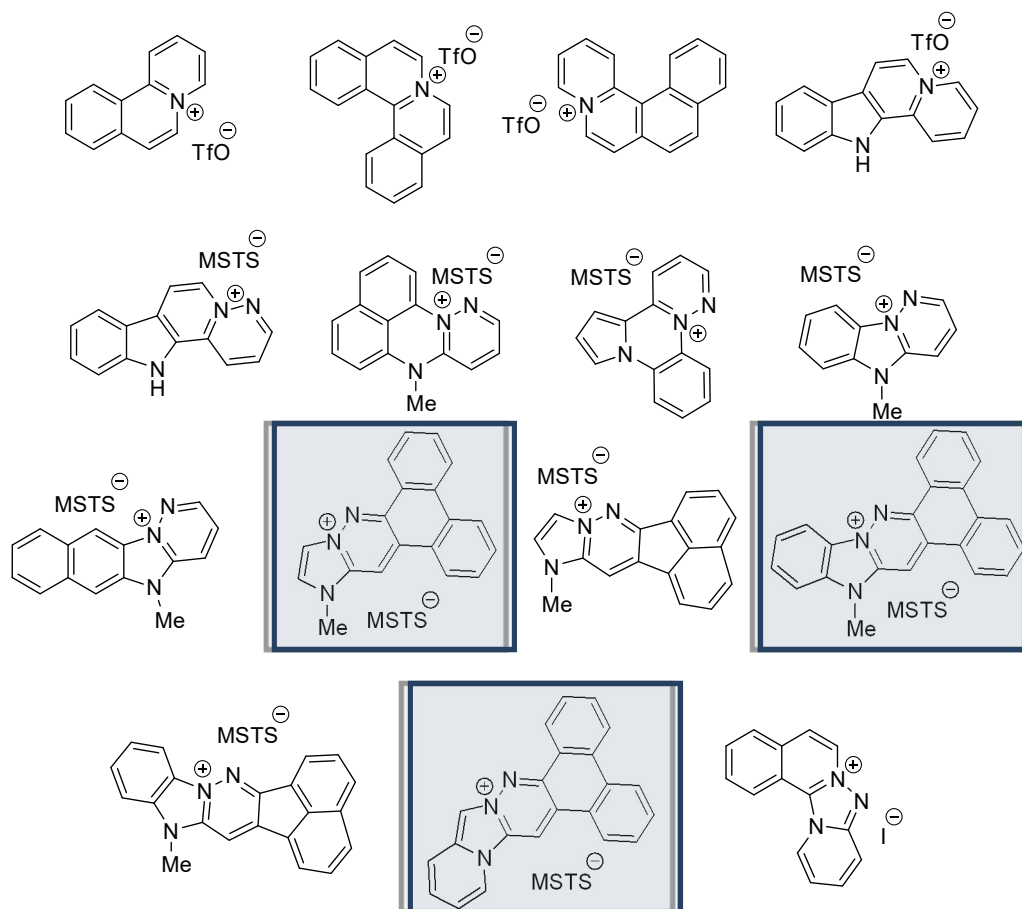


Figura 5. Estructura de los cromóforos estudiados en esta Tesis

Desde un punto de vista metodológico se ha utilizado la condensación de Westphal³⁶ como paso clave para la síntesis de los compuestos incluidos en la Figura 5. En esta metodología sintética, se usarán como productos de partida sales de azinio o azolio⁶⁹ para generar en medio básico iluros estabilizados capaces de comportarse como 1,4-dinucleófilos, los cuales, se hacen reaccionar con compuestos 1,2-dielectrófilos para obtener los correspondientes cationes heterocíclicos aromáticos con nitrógeno en posición cabeza de puente (Figura 6).

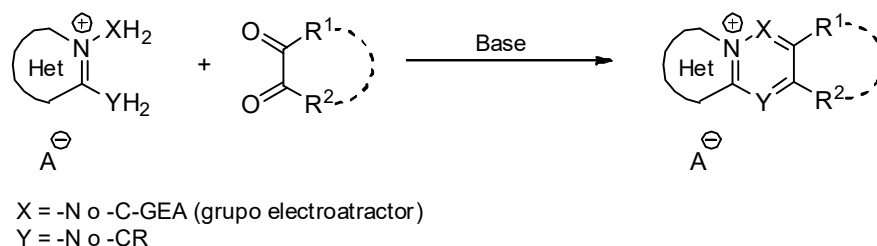


Figura 6. Condensación de Westphal

La obtención de derivados de los sistemas seleccionados obtenidos por la condensación de Westphal^{36, 70, 69} se llevará a cabo mediante procesos de formación de enlaces C-C catalizados por paladio (reacción de Suzuki) para sintetizar arilderivados capaces de desactivarse desde el estado excitado mediante el giro del sustituyente arílico.

En relación con el estudio de las propiedades de los cromóforos sintetizados, el objetivo del trabajo se centra en la caracterización fotofísica de los mismos mediante valoraciones espectrofluorimétricas, dicroísmo circular y estudios computacionales.

También se estudiará su comportamiento como intercalantes de ADN, así como su potencial como sondas tipo *light-up* de esta biomolécula y se realizarán experimentos de viabilidad celular en células HeLa y se analizarán por microscopía confocal las células incubadas en presencia de estos compuestos para explorar su aplicación en tinción celular.

Antecedentes

1. ADN

1.1. Estructura secundaria del ADN

1.2. ADN como diana de unión

1.3. Modos de unión de ligandos al ADN

1.3.1. Unión covalente

1.3.2. Unión no covalente

1.3.2.1. Unión al surco

1.3.2.2. Intercalación

1.3.2.3. Unión mixta

1.4. Intercalación

1.4.1. Poliintercalación

1.4.2. Acridinas

1.4.3. Antraquinonas

1.4.4. Colorantes de cianina

1.4.5. Iones fenantridinio

1.4.6. Intercalantes catiónicos tipo azonia

1.4.6.1. Derivados de quinolizinio

1.4.6.2. Derivados catiónicos tipo azonia no benzenoides

1.4.6.2.1. Derivados de carbolina

1.4.6.2.2. Derivados de azolodiazina

1.4.6.2.3. Derivados de benzimidazol, piridoimidazol, benzotiazol

1.5. Ligandos que aumentan su fluorescencia tras intercalación (light-up probes)

2. Procesos fotofísicos

2.1. Procesos asociados a la luz

2.1.1. Procesos de absorción

2.1.2. Procesos de desactivación unimoleculares

2.1.2.1. Procesos no radiantes

2.1.2.2. Procesos radiantes

2.1.3. Procesos de desactivación bimoleculares

2.1.3.1. Desactivación o quenching

2.1.3.2. Transferencia de energía electrónica

2.2. Aplicación de fenómenos de absorción a ligandos

2.2.1. Dicroísmo circular

2.2.2. Fundamentos teóricos del Dicroísmo Circular

2.2.3. Dicroísmo circular aplicado a complejos Ligando/ADN

3. Síntesis de cationes heteroaromáticos tipo azonia

3.1. Reacciones de formación de anillo basadas en la activación de enlaces C-H

3.1.1. Activación C(sp²)-H

3.1.2. Activación C(sp³)-H

3.2. Reacciones de metátesis de cierre de anillo

3.2.1. Síntesis de quinolizínios

3.2.2. Síntesis de benzoquinolizínios

3.2.3. Síntesis de dibenzo- y naftoquinolizínios

3.3. Condensación de Westphal

3.3.1. Síntesis de sales de azinio y azolio

3.3.2. Tipos de condensaciones de Westphal en función del sustrato

3.3.2.1. Condensación tipo C-C

3.3.2.1.1. Condensación C-C con sales de azinio

3.3.2.1.2. Condensación C-C con sales de azolio

3.3.2.2. Condensación tipo N-C

3.3.2.2.1. Condensación N-C con sales de azinio

3.3.2.2.2. Condensación N-C con sales de azolio

3.3.2.3. Condensación tipo N-N

3.3.2.4. Condensación N-N con sales de azinio

3.3.3. Regioselectividad en la condensación de Westphal

3.3.4. Condensación de Westphal en fase sólida

3.3.5. Condensación de Westphal intramolecular

1. ADN

El ADN es una biomolécula en la cual se encuentra codificado todo el material genético de la mayoría de los organismos. Se trata de un biopolímero, siendo los nucleótidos sus unidades monoméricas. Cada nucleótido está formado por un nucleósido fosforilado. En cada nucleósido las bases nitrogenadas están conectadas a una molécula de D-ribosa (ARN) o D-desoxirribosa (ADN) mediante un enlace β -N-glicosídico. Aunque el grupo fosfato cargado y la fracción del monosacárido juegan papeles importantes en el reconocimiento molecular, son las bases nitrogenadas las que contienen una gran cantidad de información para el reconocimiento molecular específico.⁷¹

Las bases nitrogenadas son moléculas heterocíclicas con más de un átomo de nitrógeno y están formadas por un anillo único (pirimidina) o dos anillos fusionados (purina). Las bases nitrogenadas que con más frecuencia se encuentran en el material genético de los organismos son citosina, timina y uracilo en el grupo de las bases pirimidínicas; y adenina y guanina como bases púricas⁷² (Figura 7).

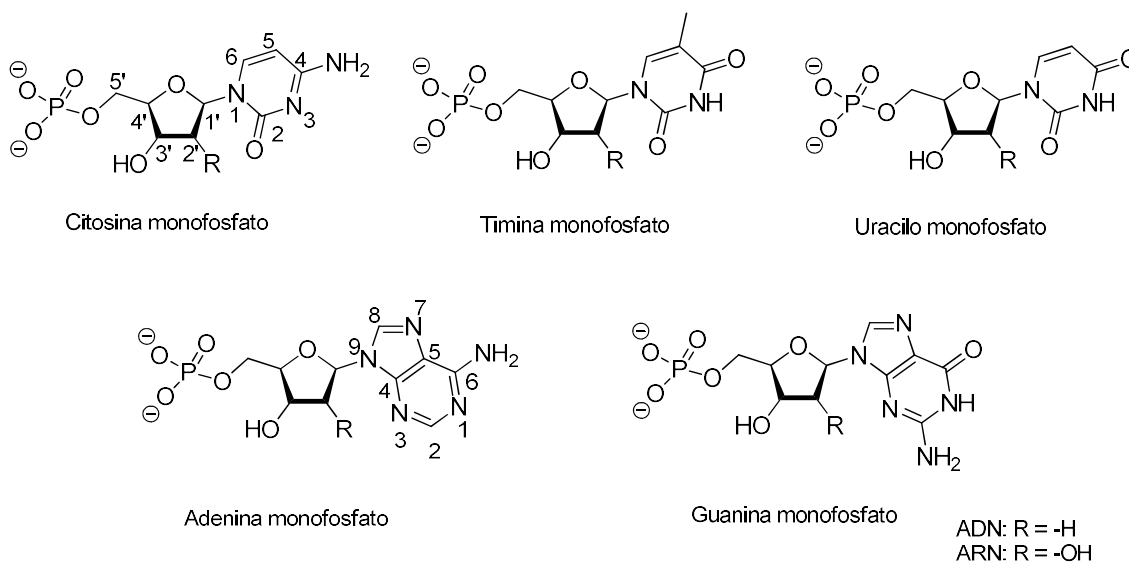


Figura 7. Nucleótidos más comunes, presentes en organismos vivos

Estas bases nitrogenadas, aparte de poseer una superficie plana aromática lo que permite un apilamiento por interacción entre las nubes π de los heterociclos, también poseen grupos

funcionales exocíclicos, lo que permite establecer interacciones direccionales por enlaces de hidrógeno.

La manifestación definitiva del potencial de reconocimiento de los nucleósidos es la formación de pares de base específicos en la estructura de doble hélice del ADN propuesta por James Watson y Francis Crick en 1953⁷³(Figura 8).

Los pares de base estándar de Watson y Crick son los patrones dominantes en las uniones por enlaces de hidrógeno en los ácidos nucleicos, sin embargo, existen otras posibilidades de unión al usar los demás sitios susceptibles de formar enlaces de hidrógeno en cada base nitrogenada. Las interacciones no canónicas son esenciales para establecer estructuras de mayor orden como la triple hélice de ADN o cuádruple G.⁷¹

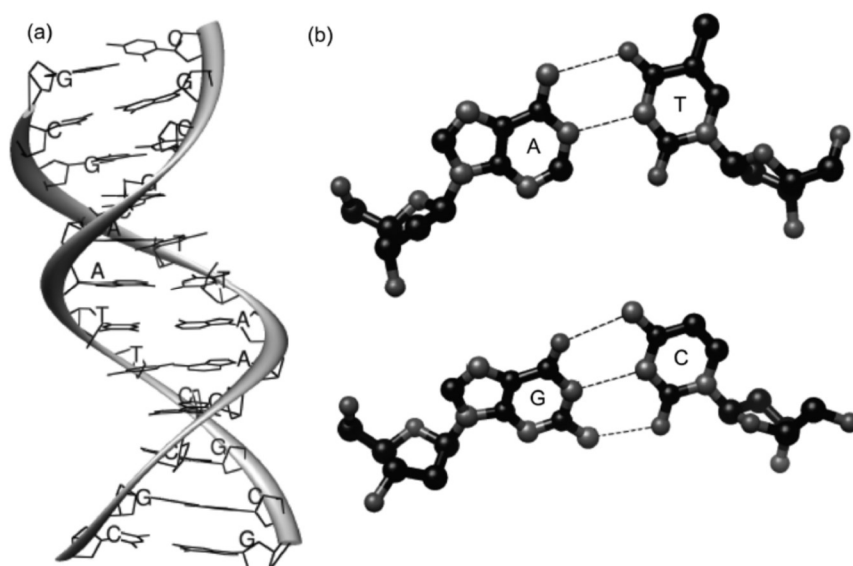


Figura 8. (a) Representación de una estructura de ADN-B en la que se observa el apareamiento entre bases. (b) Detalle del apareamiento entre bases donde las líneas punteadas son los enlaces de hidrógeno⁷¹

1.1. Estructura secundaria del ADN

La doble hélice de ADN consiste en 2 hebras complementarias y antiparalelas formadas cada una por una cadena de desoxirribonucleótidos unidos por enlaces fosfato. Ambas hebras están

unidas entre sí por enlaces de hidrógeno específicos entre las bases nitrogenadas de los nucleótidos.⁷⁴

La forma más común de esta doble hélice es la forma B, la cual fue propuesta por Watson y Crick. Es una doble hélice dextrógira en cuya cara externa hacia el medio acuoso se encuentran las unidades azúcar fosfato hidrófilas; mientras que las bases nitrogenadas, hidrófobas, se encuentran en el corazón de la hélice formando enlaces de hidrógeno entre ellas. Las bases están dispuestas de forma perpendicular al eje de la doble hélice y se encuentran apiladas paralelamente entre ellas por medio de interacciones de apilamiento π - π con una separación entre los planos formados por los pares de base de 3,5 Å. En esta conformación de ADN ambas hebras se encuentran girando hacia la derecha formándose de esta manera, dos surcos en la doble hélice llamados surco mayor y surco menor.⁷¹

Se considera la forma B del ADN como la forma más prevalente en los sistemas biológicos, aunque existen otras formas como la levógira Z-ADN o la dextrógira A-ADN más corta y ancha que la forma B⁷⁵ (tabla 1).

Tabla 1. Parámetros en las distintas conformaciones de ADN

	A	B	Z
Altura por par de bases (Å)	2,3	3,4	3,8
Diámetro de la hélice (Å)	25,5	23,7	18,4
Sentido de giro	Dextrógiro	Dextrógiro	Levógiro
Pares de base por vuelta de hélice	11	10,4	12
Longitud de vuelta de hélice (Å)	25,3	35,4	45,6
Inclinación de los pares de base respecto al eje	19°	1°	9°

Los ácidos nucleicos son polímeros cargados negativamente, por lo tanto, las interacciones electrostáticas tienen influencia en el comportamiento del ADN con iones y ligandos⁷⁶. Dentro de los surcos mayor y menor las diferencias en el potencial electrostático están determinadas principalmente por la orientación individual de cada par de bases.⁷⁷

En el surco menor, para el par de bases A-T, el potencial negativo es aportado por el N3 de adenina y el O2 de timina. En el par de bases G-C, sin embargo, la densidad de carga negativa es menor puesto que la contribución del N3 de guanina y el O2 de citosina se encuentran parcialmente neutralizadas por el N2 exocíclico.^{76, 78} En el surco menor la diferencia en el potencial electrostático entre los pares de bases puede afectar a la selectividad de unión de un ligando capaz de unirse al ADN.

En el surco mayor hay menos diferencia en el potencial electrostático entre los pares de bases A-T y G-C. El potencial negativo en el par de bases A-T viene dado por el O4 de timina y el N7 de adenina, sin embargo, hay una contribución positiva al potencial total de este par de bases y viene dado por el grupo amino en el C6 de la adenina. De manera similar, en el par de bases G-C el potencial positivo del grupo amino en el C4 de citosina disminuye parcialmente la contribución negativa al potencial total.⁷¹

El potencial electrostático de los ácidos nucleicos tiene efecto sobre las moléculas que le rodean, especialmente sobre cationes metálicos. Para reducir la carga negativa efectiva de las hebras de ADN y estabilizar sus estructuras de mayor orden, los cationes circundantes se agregan a una distancia de unos pocos ångströms de la doble hélice sin ninguna orientación particular.⁷¹

Los cationes condensados alrededor del ADN afectan energéticamente a la unión de ligandos exógenos a esta macromolécula porque compiten por el mismo espacio.⁷⁹ El desplazamiento de estos iones tras la unión tiene una contribución entrópica positiva a la energía libre total del sistema.⁸⁰⁻⁸² Puesto que los contraiones estabilizan la estructura del ADN, liberar estos iones no es favorable energéticamente y tiene una penalización en la entalpia. Experimentalmente, la unión de un ligando al ADN depende de la concentración y el tipo de disolución tampón que se esté usando, viéndose un aumento de afinidad del ligando por el ADN a medida que la concentración de sales disminuye debido a una disminución en la penalización en la entalpia por desplazamiento de iones.

El agua desempeña un rol esencial en la estabilización estructural de los ácidos nucleicos⁷⁹ y en la unión de los ligandos a estos. Como en el caso de los cationes metálicos, las moléculas de

agua son desplazadas pero es difícil cuantificar su contribución a la energía libre del sistema. Se suele suponer que al ser desplazadas por los ligandos, las moléculas de agua van hacia el disolvente dando de esta manera una contribución positiva a la entropía del sistema.⁷¹

1.2. ADN como diana de unión

Para que una molécula sea una diana terapéutica es necesario que exista una interacción con otra molécula que module su función. La elección del ADN como diana para moléculas pequeñas representa un área de gran interés a nivel farmacéutico y académico, ya que este tipo de interacciones pueden afectar a las funciones del ácido nucleico y alterar la respuesta celular teniendo interés a nivel diagnóstico y/o terapéutico.⁶⁴

Observando el dogma central de la biología⁷² (Figura 9), se aprecian varios procesos relacionados con los ácidos nucleicos susceptibles de una potencial intervención usando moléculas pequeñas cuya diana específica sean los ácidos nucleicos. Las moléculas que se unen al ADN pueden interferir con la replicación del ADN y tener un impacto en la proliferación celular o regular la transcripción y en última instancia detener la expresión de un gen.

En el ARN ocurre algo similar pudiendo usar moléculas pequeñas que se unan a esta biomolécula para mediar en la traducción a proteínas. Las moléculas capaces de unirse a ácidos nucleicos son capaces de mediar otras interconversiones entre ácidos nucleicos como es el caso de la transcripción inversa, proceso esencial para la replicación retroviral.⁷¹



Figura 9. Mecanismos de transmisión y expresión del genoma postulado por Francis Crick

La unión de moléculas pequeñas al ADN puede conllevar cambios químico-físicos sobre el ADN o el propio ligando, y dichos cambios pueden ser de utilidad para la detección de ADN en general, o bien la presencia o ausencia de determinadas regiones o secuencias dentro del mismo.

A través de la interacción de moléculas pequeñas con el ADN también se pueden modular las distintas funciones de esta biomolécula en los organismos vivos. Esta modulación es importante en el tratamiento del cáncer,¹⁰ caracterizado principalmente por una división celular descontrolada y por un acumulo de mutaciones que alteran la funcionalidad o regulación de ciertos genes, cuyos productos alteran la proliferación celular.

1.3. Modos de unión de ligandos al ADN

Los ligandos se pueden unir al ADN utilizando más de un modo. La preferencia por un modo de unión u otro está influenciada en gran medida por la estructura del ligando y las propiedades del ADN.⁷¹

Según el tipo de interacción, la unión de un ligando al ADN se puede clasificar en unión covalente, la cual implica la formación de un enlace y es irreversible, y unión no covalente, como por ejemplo uniones por enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas. La unión no covalente se subdivide a su vez en varios subtipos entre los que destacan la unión a los surcos y la intercalación.

1.3.1. Unión covalente

Los primeros agentes quimioterápicos contra el cáncer fueron aquellos que se unían covalentemente alquilando las bases nitrogenadas del ADN.⁸³ Algunos de estos compuestos siguen siendo clínicamente relevantes hoy en día. En las dos últimas décadas, se han sintetizado una gran variedad de agentes alquilantes en un intento de controlar su reactividad química para hacerlos más selectivos y disminuir sus efectos secundarios.⁴

Los agentes alquilantes reaccionan preferentemente con la posición N7 de guanina o la posición N3 de adenina, con lo que el apareamiento entre bases complementarias podría quedar inhibido conduciendo a una mala codificación en el ADN. Un mecanismo de acción de los agentes alquilantes es el de añadir un resto alquilo a las bases del ADN, una alteración que conduce a la fragmentación del ADN por las enzimas encargadas de su reparación al intentar reemplazar la base alquilada.⁴

Otro mecanismo por el cual los agentes alquilantes ejercen su función es la formación de puentes cruzados entre átomos en el ADN. En este proceso, dos bases se encuentran unidas por un agente alquilante el cual tiene dos sitios de unión, lo que evita que el ADN sea separado por enzimas para su replicación o transcripción. El último mecanismo de acción de un agente

alquilante causa que las bases nitrogenadas se encuentren apareadas incorrectamente conduciendo a mutaciones.⁴

En este grupo de compuestos se encuentran las mostazas nitrogenadas, compuestos con platino como el cis-platino o el carboplatino, las etilenaminas, los alquilsulfonatos, las nitrosoureas, los triacenos o la mitomicina C. Estos agentes en su mayoría carecen de especificidad en su acción⁸⁴ (Figura 10).

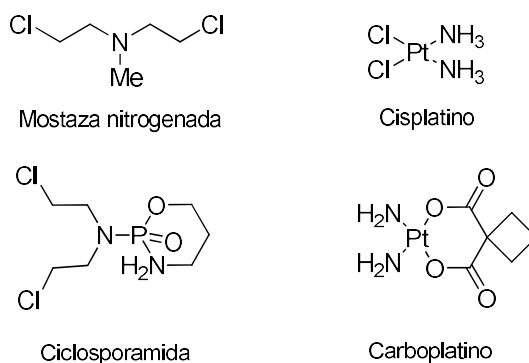


Figura 10. Ejemplos de agentes alquilantes de ADN

Otros ejemplos de moléculas que se unen covalentemente son los análogos de nucleótidos (Figura 11) que son incorporados al ADN por enzimas pudiendo impedir su síntesis y/o alterar el ciclo celular. Ejemplos de estas moléculas son el AZT-monofosfato y lamivudina,⁸⁵ o el tenofovir,⁸⁶ empleados como inhibidores de la transcriptasa inversa para el tratamiento del VIH o la hepatitis B en el último ejemplo.^{87, 88}

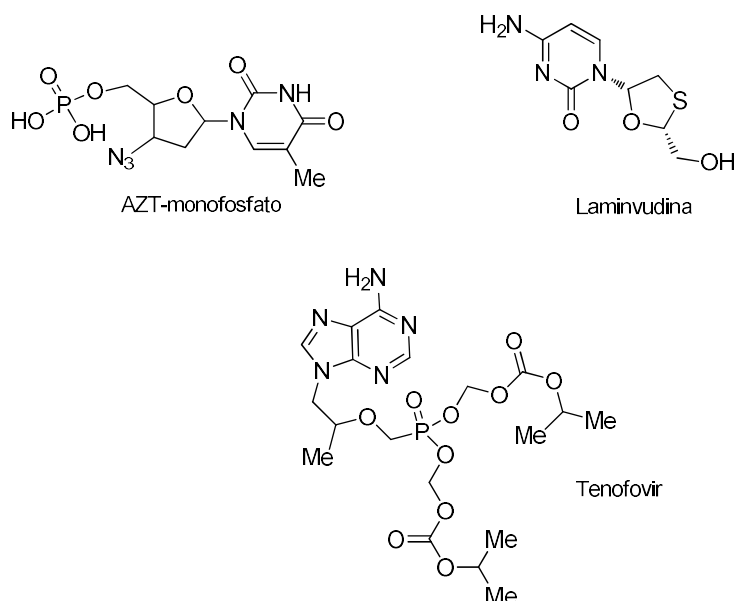


Figura 11. Ejemplos de análogos de nucleótidos que se unen covalentemente al ADN

1.3.2. Unión no covalente

1.3.2.1. Unión al surco

Un tipo de moléculas pequeñas con capacidad de interaccionar con el ADN son los agentes que se unen a los surcos del mismo. En principio, estas moléculas pueden unirse al surco menor o al surco mayor de la doble hélice de ADN. Las dimensiones y las formas de los surcos son distintas; por lo tanto, las moléculas que se unan a cada surco tienen estructuras bien diferenciadas.

El surco mayor es más ancho que el surco menor. Debido a esta diferencia de tamaños, el primero de ellos es el sitio de unión preferente para las proteínas que interaccionan con el ADN formando enlaces de hidrógeno específicos con los grupos funcionales que apuntan al exterior en los pares de base.

El surco mayor muestra variabilidad en su tamaño y forma en función de la secuencia de ADN y también posee un mayor número de grupos aceptores y donadores de enlaces de hidrógeno así como una gran variabilidad en la disposición de estos en la doble hélice. El reconocimiento

en este surco normalmente incluye unidades cilíndricas de reconocimiento en las proteínas basadas en hélices alfa, ya que estas unidades tienen el tamaño y la forma adecuados para caber cómodamente en el surco. Las estructuras presentes en estas proteínas suelen ser hélice-giro-hélice, dedos de zinc y cremalleras de leucina.⁷⁸

Los residuos de aminoácidos en el exterior de la hélice alfa se emplean para formar enlaces de hidrógeno con las bases del ADN incluyen arginina (grupo guanidinio), histidina (-NH de imidazol), lisina (-NH₂), serina (-OH) asparragina, glutamina (-CONH₂ en ambos casos) y glutamato (carboxilato).

La unión al surco menor (Figura 12) la llevan a cabo preferentemente agentes sintéticos. Estas moléculas tienen por lo general forma de media luna compuesta por ciclos aromáticos unidos y se encuentran cargados positivamente,⁷¹ aunque también es posible esta interacción en compuestos neutros.⁸⁹ Las fuerzas que gobiernan la unión entre moléculas pequeñas y el surco menor del ADN son las interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals y enlaces de hidrógeno, las cuales son capaces de salvar la penalización energética debida al desplazamiento de las moléculas de agua.⁷¹

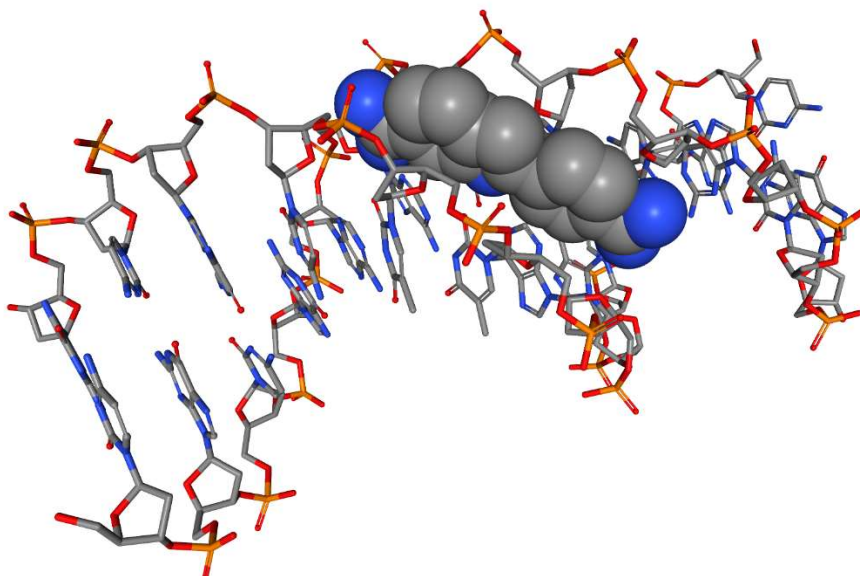


Figura 12. Unión de DAPI al surco menor del ADN (PDB ref. 1D30)

Frecuentemente, las moléculas que se unen al surco menor presentan una pronunciada selectividad por zonas ricas en A-T, las cuales tienen un mayor potencial electrostático que aquellas ricas en G-C. Las zonas ricas en G-C poseen el impedimento estérico causado por el grupo 2-amino de guanina lo que dificulta la unión de estas moléculas. Además, la topología del surco en zonas ricas en A-T permite un llenado más fácil de la zona de unión y un entorno más favorable para las interacciones de Van der Waals.⁴

Entre las moléculas catiónicas capaces de unirse al surco menor del ADN destacan los productos naturales netropsina y distamicina⁹⁰ así como diarilaminas sintéticas tales como DAPI⁹¹ (Figura 13) y berenil⁹² y bis-benzimidazoles como Hoechst 33258,⁹³ que han sido estudiadas ampliamente.

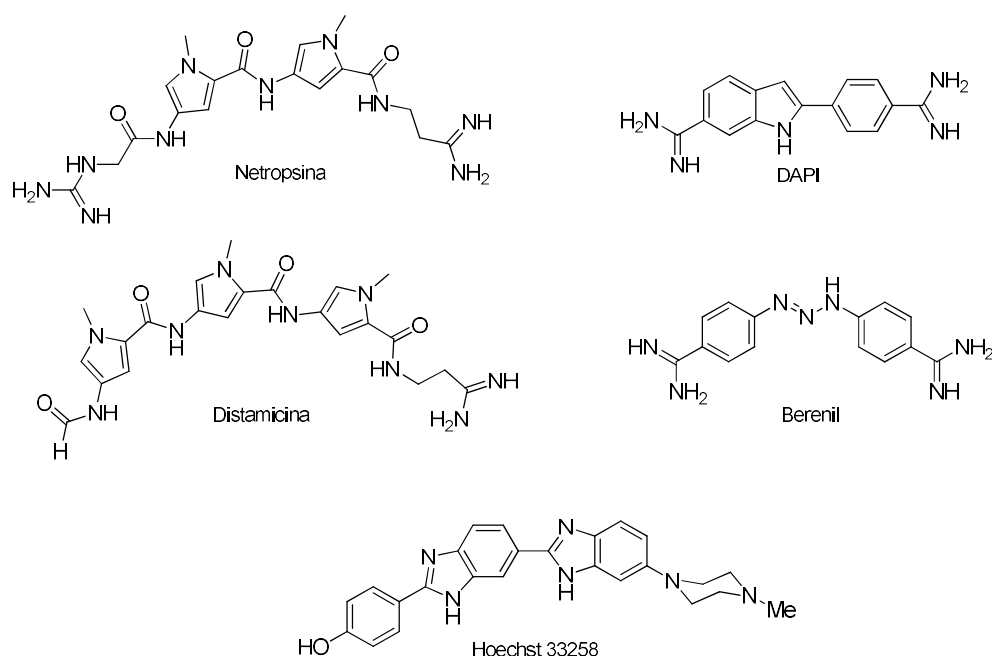


Figura 13. Ejemplos de compuestos que se unen al surco menor del ADN

1.3.2.2. Intercalación

Los agentes intercalantes son aquellos con capacidad para insertarse entre dos pares de bases adyacentes. Suelen ser compuestos aromáticos planos que presentan anillos fusionados. Este tipo de unión al ADN se tratará más extensamente en el apartado siguiente.

1.3.2.3. Unión mixta

Los compuestos capaces de unirse a la doble hélice de ADN lo hacen más frecuentemente mediante intercalación o unión al surco menor, sin embargo hay moléculas capaces de presentar ambos comportamientos y son capaces de interaccionar más fuertemente con el ADN que aquellas que solo presentan un modo de unión y por tanto presentan un mayor tiempo de residencia interfiriendo de manera más prolongada con las enzimas encargadas de procesar el ADN.^{94, 95}

Estas moléculas híbridas por su modo de unión están compuestas de intercalantes basados en análogos de amsacrina, elipticina, antraquinonas y mitoxantrona; y de unidades que se unen al surco menor basadas en análogos de netropsina o distamicina A.⁹⁵ Un ejemplo de estas moléculas también conocidas como combilexinas, es NetAmsa la cual es un derivado híbrido de netropsina y amsacrina (Figura 14).

Este tipo de moléculas, en principio, deberían tener una mayor especificidad de secuencia comparadas con monointercalantes o aquellas que sólo se unen al surco menor.

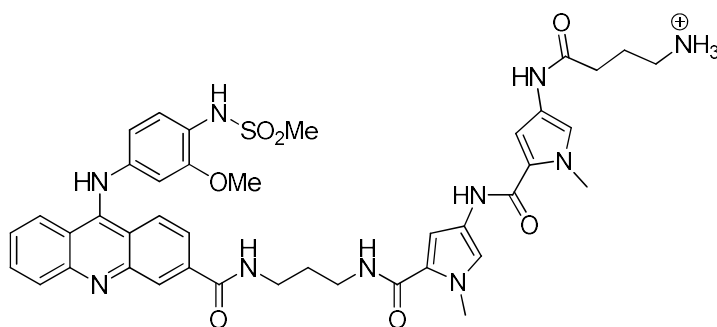


Figura 14. NetAmsa, ejemplo representativo de combilexina

1.4. Intercalación

En una doble hélice de ADN, las bases nitrogenadas se encuentran apiladas de manera casi coplanar, lo que permite que moléculas aromáticas policíclicas planas se inserten entre dos pares de bases² comportándose como intercalantes. Este hecho fue observado por Leonard Lerman en 1963 al estudiar algunas acridinas modificadas como la proflavina.

La interacción entre la molécula de ADN y el intercalante puede ser bastante fuerte, a pesar de la energía consumida al separarse las bases en el proceso de intercalación y el desenrollamiento parcial de la doble hélice de ADN. Las energías que estabilizan este modo de unión son las electrostáticas,¹² dipolo-dipolo y apilamiento π ⁹⁶ del compuesto intercalante con las bases nitrogenadas del ácido nucleico (Figura 15). Del análisis de datos obtenidos mediante calorimetría se puede concluir que las interacciones de Van der Waals y la hidrofobicidad dentro del sitio de intercalación son muy importantes para una intercalación eficiente.⁹⁷

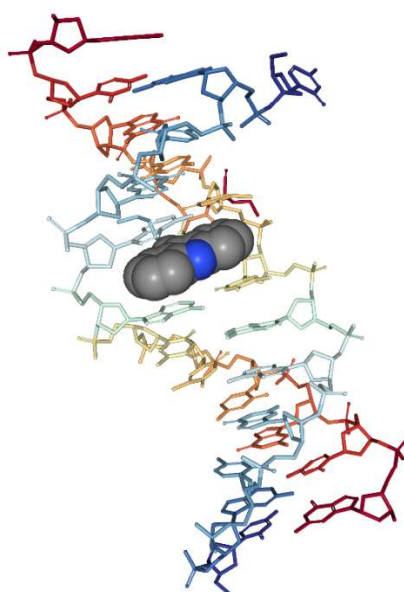


Figura 15. Intercalación de una molécula de acridina (PDB ref. 1G3X)

La intercalación es por lo general, un proceso independiente de la secuencia de pares de base, por lo tanto, carece de selectividad por una secuencia concreta, sin embargo, se ha observado que algunos intercalantes tienen preferencia por fragmentos ricos en adenina-timina (AT) o guanina-citosina (GC).

Una carga positiva externa parece ser esencial para la intercalación de compuestos aromáticos sencillos, puesto que estos compuestos solo intercalan en caso de tener dicha carga positiva en alguna cadena lateral.⁹⁸ Sin embargo al añadir un anillo fusionado a derivados de naftaleno o quinolinio se obtienen intercalantes más eficaces que, además, no requieren la presencia de sustituyentes cargados positivamente.⁹⁹

Las moléculas que se unen al surco alteran muy poco la estructura del ADN, sin embargo, los intercalantes tienen una gran influencia en esta debido a la necesidad de desenrollar la molécula de ADN y de esta manera permitir la entrada del intercalante entre dos pares de bases. Este desenrollamiento de la doble hebra de ADN conduce a una elongación de 3,4Å, el cual causa un cambio conformacional significativo¹⁰⁰ que contribuye a dificultar o impedir la unión a proteínas alterando de esta manera la funcionalidad del ADN.

Como se ha dicho en la introducción, una molécula capaz de intercalarse en ADN ha de ser aromática policíclica y plana, características que van ligadas a sistemas con una alta conjugación, hecho que permite que las moléculas intercalantes presenten absorción y emisión de fotones tras una excitación previa. Sus propiedades de absorción y de emisión se verán afectadas tras la unión al ADN, lo que permite cuantificar esta unión por medios espectrofotométricos.³

Las sondas pueden intercalarse en ADN con su eje mayor paralelo o perpendicular al eje del bolsillo formado por los pares de base. La elongación y desenrollamiento de la doble hebra de ADN aumenta el espacio entre fosfatos a lo largo de la cadena, disminuyendo de esta manera la densidad de carga a lo largo de la doble hélice. El cambio resultante en el potencial electrostático en la superficie del ADN lleva a una liberación de contraiones de los surcos lo que contribuye favorablemente a la energía libre de unión.¹⁰¹ Si el intercalante lleva una carga positiva, la asociación con el ADN permite una liberación adicional de contraiones de los surcos, de esta manera la intercalación de moléculas cargadas resulta más favorable energéticamente.⁹⁹ Se ha observado que la unión de un intercalante entre dos pares de bases de la doble hebra de ADN impide el acceso de otro intercalante a una posición contigua al bolsillo de unión,¹⁰² lo que presumiblemente sea debido a un cambio conformacional tras la

intercalación lo que lleva a un acceso limitado por impedimento estérico de las posiciones vecinas al bolsillo de unión del intercalante (principio de exclusión en sitios vecinos). Además, la intercalación reduce el potencial negativo del sitio de unión y, por lo tanto, las interacciones electrostáticas atractivas en las zonas vecinales a la intercalación no tienen lugar.

Las constantes de unión para la formación de complejos de intercalación entre moléculas orgánicas y ADN van desde 10^4 a 10^6 M⁻¹ y son, por lo general, significativamente más pequeñas que las constantes de unión para las moléculas que se unen al surco.

Como se ha mencionado, los intercalantes ejercen su acción insertándose entre dos pares de bases y de esta manera son capaces de distorsionar la conformación del ADN interrumpiendo la unión de proteínas a esta macromolécula interfiriendo con la replicación del material genético del sitio donde intercalan. Se ha observado también que algunos intercalantes pueden influir en la actividad de las topoisomerasas, las cuales son enzimas muy importantes en el funcionamiento de la célula encargadas del desenrollamiento del ADN. Las topoisomerasas se unen al ADN formando un complejo que inicialmente induce la rotura de una de las hebras del ADN, luego las hebras son reorganizadas y finalmente se vuelve a unir la molécula de ADN. El objetivo final de este proceso es la relajación de la estructura del ADN.^{103, 104} Por tanto, influyendo en estas enzimas, se puede suprimir la proliferación celular de dos maneras:¹⁰⁵

- Intercalando el fármaco en el sitio de unión de la topoisomerasa se impide la formación del complejo ADN-topoisomerasa y esta no puede realizar su función.
- El intercalante, el ADN y la topoisomerasa forman un complejo ternario el cual es más estable que el complejo ADN-topoisomerasa. La estabilidad de este complejo conduce a un mayor tiempo con el ADN fragmentado y el empalme de la hebra de ADN no puede tener lugar. De esta manera la topoisomerasa actúa como un veneno endógeno y puede inducir apoptosis.⁹⁹

1.4.1. Poliintercalación

Muchos intercalantes tienen tiempos de residencia entre los pares de base menores de 1 ms, este hecho es una desventaja a la hora de aplicar estas moléculas como fármacos los cuales deben suprimir la proliferación mediante el bloqueo en el ADN del sitio de unión de algunas enzimas.

Para solventar este problema, se diseñaron derivados que llevasen dos o más unidades intercalantes unidas mediante un *linker* alquílico en la misma molécula. El diseño de bisintercalantes basados en subunidades de acridina unidas por una cadena alquílica fue descrito por Le Pecq¹⁰⁶ y Cain.¹⁰⁷

Las constantes de asociación de estos poliintercalantes son mayores a la de un intercalante simple. Los cálculos teóricos predicen que en ausencia de efectos estéricos importantes y factores entrópicos las constantes de asociación de los bisintercalantes deberían ser el cuadrado de la constante del correspondiente monómero.¹⁰⁸ A pesar de esto las constantes calculadas experimentalmente son mucho menores, debido presumiblemente, a un efecto geométrico desfavorable.

Como se ha comentado, estas moléculas poseen un *linker* o conector entre las unidades capaces de intercalar, y cabe mencionar que para no violar el principio de exclusión en sitios vecinos este conector debe ser de al menos 10,2 Å. En los casos en que esta cadena alquílica tenga un tamaño menor, solo tendrá lugar la monointercalación (Figura 16).⁹⁹

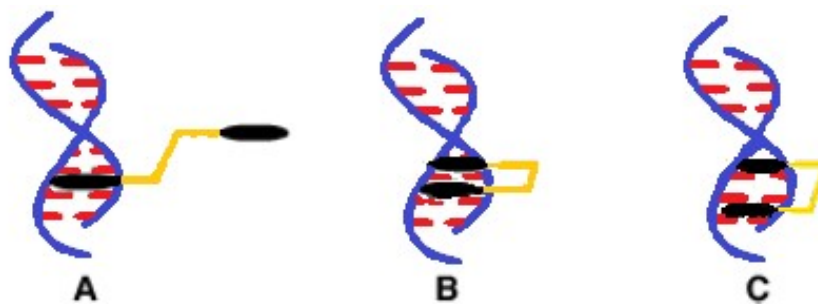


Figura 16. Modo de unión de los bisintercalantes dependiendo de la longitud de la cadena alquílica (A) Monointercalación (B) Bisintercalación violando el principio de exclusión en sitios vecinos (C) Bisintercalación

Cabe mencionar que mediante la poliintercalación se pueden conseguir moléculas selectivas de una secuencia concreta de ADN. Basándose en la observación de como algunas poliamidas capaces de unirse al surco del ADN, tales como netropsina y distamicina, interaccionan con secuencias concretas,^{109, 110} se pueden conseguir bisintercalantes capaces de unirse selectivamente al ADN. Estas consiguen esta selectividad mediante la formación de enlaces de hidrógeno específicos con los restos accesibles de las bases nitrogenadas desde el surco del ADN. Un ejemplo representativo de este tipo de moléculas es la bisacridina mostrada en la

figura 17,⁹⁹ cuyas unidades intercalantes se encuentran unidas mediante un linker basado en una cadena de poliamida con grupos pirrol e imidazol necesarios para la selectividad.

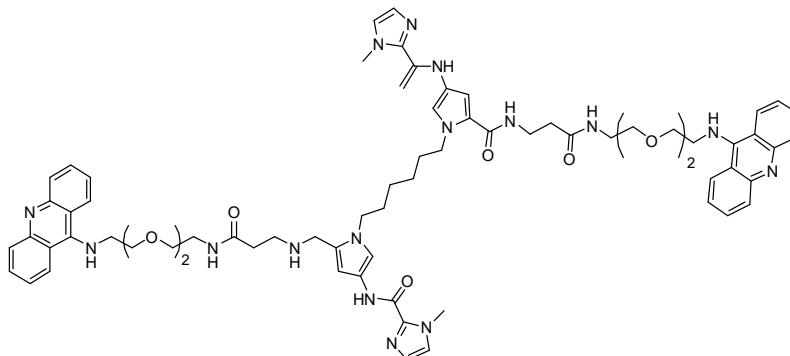


Figura 17. Bisintercalante con selectividad de secuencia

1.4.2. Acridinas

Las acridinas y sus derivados son un tipo de intercalante cuyas interacciones con el ADN han sido ampliamente estudiadas.¹¹¹⁻¹¹⁴ El nitrógeno que incluyen en su estructura se encuentra protonado incluso a pH neutro y el compuesto catiónico aromático resultante es un intercalante prometedor. Los derivados de acridina presentan un alto potencial para su aplicación en quimioterapia.⁹⁹ Hasta la fecha, se han sintetizado, así como evaluado su actividad biológica y potencial actividad clínica, un gran número de derivados con este núcleo estructural.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Entre estos, se encuentran las quinacrininas usadas clínicamente como fármaco contra la malaria, la amsacrina usada en tratamientos contra leucemia y las carboxamidas derivadas de acridina.⁹⁹

Se han empleado derivados de acridina para evaluar el efecto de la afinidad con la que un intercalante se une al ADN sobre la citotoxicidad del mismo.¹⁰⁷ Se podría esperar que los intercalantes con constantes de afinidad mayores tuviesen también el potencial citotóxico más elevado, sin embargo, se ha visto que las uniones fuertes entre el intercalante y el ADN son contraproducentes para la difusión del fármaco en el medio extravascular.¹¹⁸ De acuerdo con este estudio, cuanto mayor sean las constantes de afinidad del intercalante, habrá una menor

difusión extravascular del mismo en el medio y como resultado, habrá una menor citotoxicidad. En consecuencia se ha propuesto que un fármaco debe tener constantes lo suficientemente elevadas como para dar intercalación pero lo suficientemente bajas para permitir la difusión dentro de la totalidad del volumen de tejido diana.¹⁰⁷

El mecanismo por el cual los fármacos basados en acridina ejercen su acción citotóxica es mediante la supresión de la actividad de las topoisomerasas, las cuales como ya se ha mencionado, son enzimas esenciales para el funcionamiento del ADN.

Los derivados diamino sustituidos proflavina (**Ia**) y naranja de acridina (**Ib**) (Figura 18) son ejemplos clásicos y representativos de sondas de este tipo de intercalantes y han sido estudiadas en detalle. Ambas moléculas intercalan ADN y son capaces de absorber y emitir en el área UV/visible lo cual puede ser usado para evaluar la unión al ADN mediante valoraciones espectrofoto y espectrofluorimétricas.¹

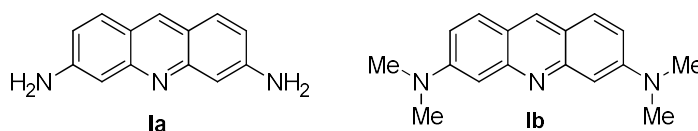


Figura 18. Proflavina (izquierda) y naranja de acridina (derecha)

1.4.3. Antraquinonas

Las propiedades de unión al ADN de los derivados de antraquinona han sido estudiadas durante los últimos 25 años por su potencial como fármacos para el tratamiento del cáncer. El sistema de antraquinona se encuentra en muchos fármacos antitumorales, como las antraciclinas, la mitoxantrona, la ametantrona y derivados.¹¹⁹⁻¹²¹

Las propiedades citotóxicas de las antraquinonas resultan de su unión al ADN dentro de las células.^{122, 123} La planaridad de estas moléculas permite que se intercalen entre los pares de base del ADN, mientras que sus propiedades redox pueden ser usadas para la formación de radicales reactivos en sistemas biológicos.

La actividad biológica de los derivados de antraquinona se encuentra muy influenciada por los sustituyentes. Las cadenas laterales llevan una o dos cargas positivas para establecer interacciones electrostáticas con el esqueleto fosfato del ácido nucleico.

Los agentes intercalantes con potencialidad para establecer puentes cruzados entre las hebras de ADN son considerados buenos fármacos antitumorales, sin embargo, es necesaria una mayor selectividad a la hora de ejercer su efecto terapéutico.¹²⁴⁻¹²⁶ La mitomicina C (**II**) es un agente alquilante que forma enlaces covalentes con las 2 hebras de ADN dando como resultado la formación de puentes cruzados entre las dos hebras en un principio independientes,¹²⁷ sin embargo, este compuesto no es capaz de intercalar la doble hélice de ADN. Para solventar este inconveniente, se han sintetizado los derivados de antraquinona con un anillo de 5 miembros fusionado el cual lleva un fragmento de aziridina **IVa-b** (Figura 19). El fragmento de antraquinona es capaz de intercalar una doble hebra de ADN y posteriormente forma puentes cruzados con el ácido nucleico tras la activación biorreductora de la aziridina.

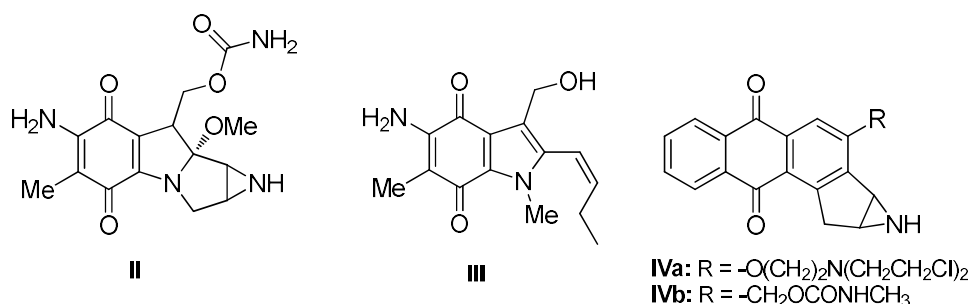


Figura 19. Derivados de antraquinona capaces de establecer puentes cruzados entre hebras de ADN

1.4.4. Colorantes de cianina

Los derivados de cianina poseen la estructura general **V**.¹²⁸ Las correspondientes bis-cianinas **VI** son particularmente útiles como sondas fluorescentes (Figura 20). Puesto que presentan una alta afinidad por la asociación con ácidos nucleicos, junto con un cambio en sus propiedades fotofísicas tras la unión con el ADN, son particularmente útiles para la detección y cuantificación de ADN en una gran variedad de técnicas como PCR, marcaje de ADN, citometría de flujo y evaluación de la actividad biológica.

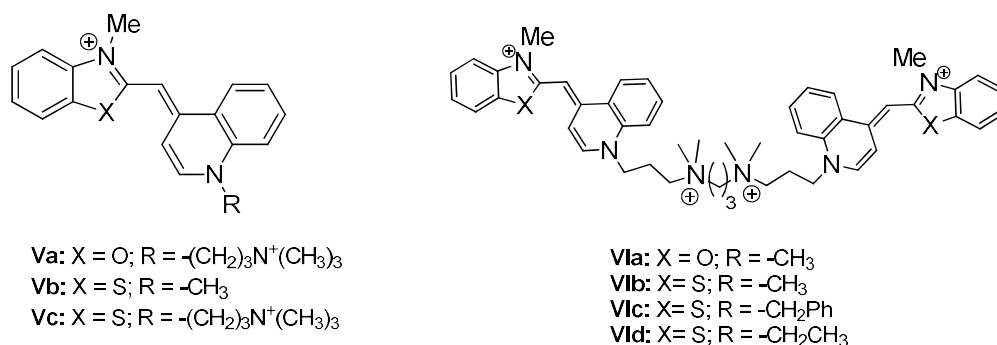


Figura 20. Estructura general de cianinas y bis-cianinas

Las estructuras **V** y **VI** son un ejemplo representativo de colorantes de cianina, los cuales tienen buenas propiedades para su aplicación en técnicas fluorimétricas. Las moléculas que no se encuentran unidas al ADN no presentan fluorescencia en disolución, sin embargo presentan elevados rendimientos cuánticos de emisión al unirse a ADN,¹²⁹ probablemente debido a que al estar unidas a esta macromolécula tiene menos opciones de desactivación fotoquímica, por ejemplo isomerización *cis-trans* en el interior del ADN¹³⁰ debido a la restricción de espacio entre los pares de base, lo que impide la isomerización del doble enlace al irradiar la molécula, esto hace que la desactivación tenga lugar de manera radiativa. Las elevadas constantes de afinidad y coeficientes de extinción molares resultan en una gran diferencia en la intensidad de fluorescencia entre el ADN marcado y el fondo.

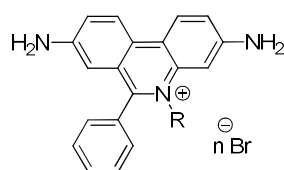
El modo de interacción predominante para **Va** es la intercalación y para **Vla** es la bisintercalación con constantes de unión elevadas ($K = 6,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ en tampón fosfato, a pH=7 [NaCl] = 100 mM, ct-DNA).¹³¹

Otra interacción de estas moléculas con ADN es su unión externa a esta molécula a elevados ratios sonda/DNA.^{132, 133} Ambos modos de unión no dependen solamente de la concentración del ligando, sino que también están influenciados por la presencia de contracciones en disolución.

Como se ha mencionado anteriormente estas sondas presentan un aumento de la intensidad de fluorescencia tras la unión con ADN, este aumento puede ser unas 3000 veces mayor que el de la sonda libre en disolución.¹³⁴

1.4.5. Cationes fenantridinio

El bromuro de etidio **VIIa** y de propidio **VIIb** (Figura 21) son probablemente las sondas de ADN más conocidas del tipo fenantridinio y son consideradas como estándares en intercalación.¹³⁵⁻¹³⁷ Sin embargo, a ratios sonda/DNA elevados, el bromuro de etidio es capaz de unirse tanto en el sitio de intercalación como también a un sitio de unión secundario a lo largo del esqueleto fosfato, presumiblemente debido a una asociación electrostática entre moléculas^{137, 138} o mediante la formación de enlaces de hidrógeno.¹³⁹ Se ha propuesto que esta unión secundaria al ADN tenga lugar preferentemente en los surcos menores con un alto contenido en GC.⁹⁹



VIIa: R = -CH₂CH₃; n = 1

VIIb: R = -(CH₂)₃N⁺CH₃(CH₂CHCH₃)₃; n = 2

Figura 21. Bromuro de etidio (**VIIa**) y de propidio (**VIIb**)

Mientras que la intercalación puede ser considerada un tipo de unión no competitivo, las interacciones con el esqueleto fosfato de los cationes fenantridinio son competitivas, puesto que el intercalante compite con los cationes metálicos los cuales se encuentran normalmente en disolución⁹⁹ para desplazarlos.

La adición de ADN a una disolución de bromuro de etidio tiene como resultado un aumento batocrómico en el máximo de absorción.¹⁴⁰ Este compuesto presenta un rendimiento cuántico de emisión muy bajo en disolución acuosa o alcohólica, si bien en disolventes orgánicos apolares los rendimientos cuánticos aumentan ligeramente.¹⁴¹ Sin embargo, es altamente fluorescente cuando se intercala en la doble hebra de ADN.¹⁰⁶ Se ha propuesto una transferencia de protón en el estado excitado entre el bromuro de etidio y el disolvente, lo cual conduce a una desactivación no emisiva de la sonda. Este efecto es suprimido en el entorno hidrofóbico entre los pares de base del ADN.¹⁴¹ Se ha propuesto también un aumento entre la brecha energética entre el singlete excitado y los estados triplete tras la intercalación, lo cual parece ser la razón de este aumento en la emisión.¹⁴²

El aumento en la fluorescencia tras la intercalación de los cationes fenantridinio es la razón de que su uso este tan extendido en el campo de la bioanalítica. Sin embargo, el uso de este aumento en la emisión como una herramienta cuantitativa debe ser tratado con cuidado, puesto que la emisión del bromuro de etidio intercalado puede ser desactivada por las moléculas no intercaladas de esta sonda;¹⁴³ entonces las moléculas no unidas de bromuro de etidio deben ser tomadas en consideración de cara a un análisis cuantitativo.

1.4.6. Intercalantes catiónicos con nitrógeno cuaternario en posición cabeza de puente

1.4.6.1. Derivados de quinolizinio y azaquinolizinio

El interés en los intercalantes de ADN basados en el núcleo de quinolizinio nace de los primeros estudios llevados a cabo sobre la coralina (**VIII**) (Figura 22). En uno de los primeros estudios sobre este compuesto, se estableció que era capaz de interaccionar con el ADN,¹⁴⁴ siendo esta interacción la causa de su actividad biológica. Así, se observó que este alcaloide presenta actividad antileucémica¹⁴⁵ y, aunque su actividad antitumoral no es muy alta, constituye una molécula prometedora sobre la cual realizar cambios estructurales y de sustituyentes, debido a su baja toxicidad.^{146, 147}

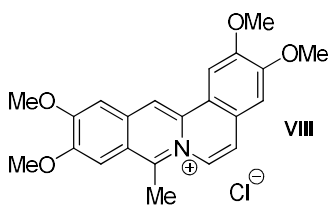


Figura 22. Estructura de la coralina

En estudios posteriores, se observó que la coralina no solo era capaz de intercalar ADN si no que, a ratios intercalante/ADN elevados, era capaz de unirse al esqueleto fosfato donde se agrega por apilamiento π .^{148, 149}

También se evaluó la selectividad de la coralina por fragmentos de ADN con ratios variables GC/AT mediante valoraciones espectrofotométricas y espectrofluorimétricas, estudios viscosimétricos y dicroísmo circular,³ experimentos que revelaron que la coralina tiene una ligera preferencia por regiones de ADN ricas en GC.

Desafortunadamente, la coralina tiende a agregarse en agua incluso a bajas concentraciones. Por ello, es necesario usar estos agregados en lugar de moléculas independientes para llevar a cabo la mayoría de los experimentos, lo cual puede tener influencia en las propiedades ópticas del sistema. Maiti y colaboradores presentaron este problema y observaron que en disoluciones acuosas que contengan un 30% (v/v) de etanol es posible suprimir la agregación de este compuesto, permitiendo realizar valoraciones espectrofotométricas con monómeros de coralina no agregados. Se ha observado que estas concentraciones de etanol no perturban la estructura del ADN.¹⁵⁰

Presumiblemente, la característica biológica más importante de la coralina está directamente conectada con su habilidad para intercalar moléculas de ADN. Este compuesto es capaz de actuar formando un complejo irreversible con la topoisomerasa I, lo cual produce su inhibición. Las topoisomerasas, como ya se ha mencionado, son enzimas capaces de desenrollar las moléculas de ADN y de esta forma poder llevar a cabo procesos tales como la replicación o la transcripción. Estas enzimas son capaces de cortar el ADN para liberar tensión en la molécula y, una vez que se ha desenrollado, vuelve a unir los fragmentos separados.^{104, 105} La coralina forma un complejo triple muy estable con el ADN y la topoisomerasa I. Esta estabilidad evita que después de que la topoisomerasa haya realizado un corte en la molécula de ADN, esta vuelva a unirse. Al no poder volver a unirse, el ADN pierde su funcionalidad y esto es interpretado por la célula como una señal de apoptosis. Hay que resaltar, por tanto, que la coralina no es un inhibidor de topoisomerasa, dado que los inhibidores se unen al sitio activo de la enzima mientras que este derivado actúa por el mecanismo detallado anteriormente.

El primer derivado con un núcleo de quinolizinio estudiado sin una estructura similar a coralina fue el producto natural sempervirina (**IX**)¹⁵¹ (Figura 23). Mediante valoraciones espectrofotométricas, se observó que este alcaloide se une al ADN, si bien también presenta una tendencia a formar agregados por apilamiento π a lo largo del esqueleto fosfato, lo cual distorsiona los espectros de absorción en las valoraciones.

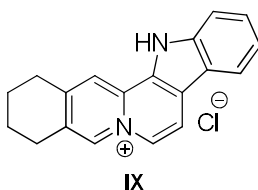


Figura 23. Estructura de sempervirina

Estudios de viscosimetría y dicroísmo circular evidenciaron una unión al ADN por medio de intercalación que tiene lugar junto con esta asociación de agregados al esqueleto fosfato.

Más recientemente, se han estudiado otros derivados sintéticos de quinolizinio con distintos patrones en la disposición de sus anillos^{25, 152} (Figura 24), observándose como tendencia general un desplazamiento del máximo de absorción hacia el rojo tras interactuar con el ADN.³

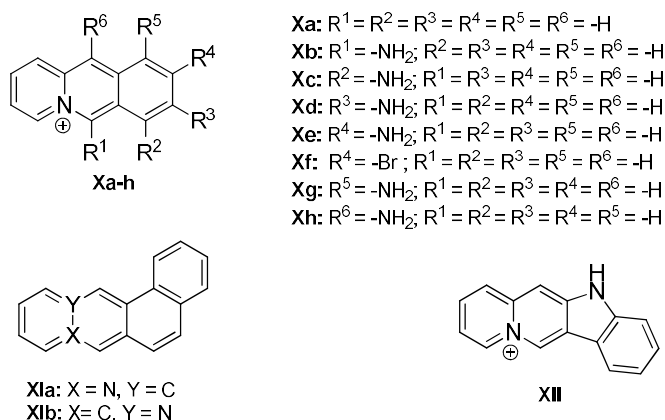


Figura 24. Ejemplos de derivados de quinolizinio estudiados como intercalantes de ADN

Los sistemas de benzoquinolizinio (**Xa-h**) tienen una constante de unión de alrededor a 10^4 M^{-1} mientras que las constantes de unión para los derivados nafto (**XI**) o indoloquinolizinio (**XII**) tienen constantes de un orden de magnitud mayores.³ Se ha observado que extender el sistema π de los intercalantes mejora su afinidad por el ADN, por ejemplo, añadir un benceno fusionado a una molécula aumenta su energía de unión en 4,0 kcal/mol.

Por otro lado, reemplazar el carbono contiguo al nitrógeno cuaternario en los derivados de quinolizinio con otro nitrógeno da como resultado derivados de azaquinolizinio, los cuales han mostrado que también son capaces de unirse al ADN^{153-155, 49} (Figura 25).

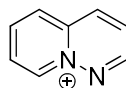


Figura 25. Núcleo de 1-azaquinolizinio

En estudios detallados los indoloazaquinolizínios mostraron tener unas constantes de afinidad por el ADN³ de alrededor de 10^5 M^{-1} . De manera similar a los quinolizínios, en la unión de los azaquinolizínios al ADN se observa por un desplazamiento hacia el rojo de los máximos de absorción de unos 10 o 16 nm. La comparación entre distintos derivados alquilados de indoloazaquinolizínio no condujo a establecer una correlación entre el patrón de sustitución y sus propiedades de unión al ADN. Los estudios de viscosimetría aportan evidencias de un modo de unión intercalativo ya que revelan un aumento significativo de la longitud y el desenrollamiento de la cadena de ADN en un plásmido.

En otro estudio donde se analizaron derivados de nafto- (**XIII**) y benzonaftoquinolizínio (**XIV**) (Figura 26), se observó que estos tenían en menor o mayor medida actividad antiproliferativa contra algunas líneas celulares tumorales. Cabe mencionar que en este estudio se ha observado que algunos derivados que no son capaces de intercalar ADN tienen la misma actividad antitumoral que aquellos derivados que se comportan como intercalantes.

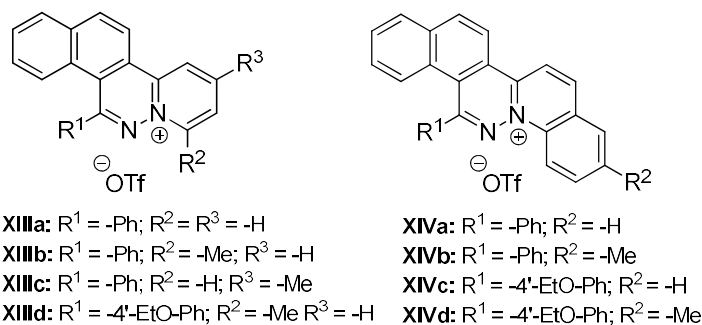


Figura 26. Derivados de nafto y benzo-nafto azaquinolizínio

En otro estudio posterior se observó por valoraciones espectrofotométricas y viscosimetría que los derivados de azaquinolizínio con un fragmento acenafto o fenantreno (**XV** y **XVI**) (Figura 27) también interaccionaban con ADN. La asociación del ADN con la sonda se observó por un desplazamiento hipsocrómico y aumento hacia el rojo de unos 10 nm en el máximo de absorción de la sonda. No se observaron puntos isosbéticos lo cual indica la formación de al menos dos complejos ADN-sonda presumiblemente con diferentes modos de unión.³

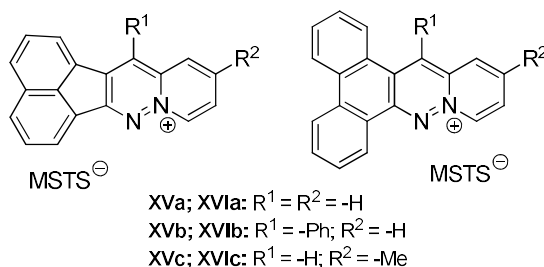


Figura 27. Derivados de azaquinolizinio

Aunque la fluorescencia de estos derivados de azaquinolizinio (**XV** y **XVI**) se desactivaba en presencia de ADN, no se observó un aumento en el máximo de emisión. Como en el caso de benzo- y naftoquinolizinio, esta desactivación se debía probablemente a una reacción de transferencia de electrones entre las bases nitrogenadas y el quinolizinio. Las valoraciones viscosimétricas realizadas sobre ADN revelaron un aumento de la viscosidad tras la adición de **XV** y **XVI**, lo que puso de manifiesto que su unión al ADN era por intercalación.³

Por otro lado, las interacciones entre ADN y derivados de quinolizinio y azaquinolizinio también pueden ser evaluadas mediante dicroísmo circular. Si bien estas moléculas carecen de una señal de CD debido a que no tienen quiralidad, al interaccionar con la molécula de ADN se les induce una quiralidad y por tanto una señal de dicroísmo circular. Por esta razón se denomina como dicroísmo circular inducido (ICD). Como las bandas de ADN no aparecen en la zona en la que absorben estos cromóforos, no se observa interferencia con las señales correspondientes a esta biomolécula quiral.

Según el tipo de señales de ICD, se puede conocer la orientación relativa del momento de transición del intercalante con respecto al par de bases e incluso el tipo de interacción. Una señal positiva intensa se asocia con una unión al surco por parte de los cromóforos. Sin embargo, si se observa una señal positiva débil, se asocia con un momento de la transición polarizado a lo largo del eje mayor del bolsillo formado por los pares de base. Por último, una señal negativa débil indica un momento de transición polarizado a lo largo del eje menor del par de bases perpendicular al eje mayor.³

1.4.6.2. Otros derivados de cationes tipo azonia no benzenoides⁶⁴

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha realizado un estudio comparativo sobre su quimioteca de cationes tipo *azonia* con el fin de obtener información sobre la capacidad de

interacción de estos ligandos con el ADN y su posible selectividad por oligonucleótidos ricos en los pares de bases nitrogenadas GC o AT. Este estudio se llevó a cabo mediante ensayos de relajación de plásmido y la observación de cambios en la temperatura de desnaturalización de las hebras en los oligonucleótidos (ensayos explicados en Materiales y métodos). De esta forma, se analizó la interacción con ADN de cromóforos derivados de carbolina, azolodiazina, piridoimidazol, benzimidazol y benzotiazol.⁶⁴

1.4.6.2.1. Derivados de carbolina

Los cromóforos basados en α - y β -carbolina presentaron el inconveniente de partida de mostrarse inestables en disolución, lo que dificultó su estudio. Por otro lado, mostraron una baja o nula interacción con oligonucleótidos ricos en GC como se demuestra en la casi inexistente modificación en las temperaturas de desnaturalización de las hebras de ADN de estos oligonucleótidos incluso a elevadas concentraciones de ligando. Sin embargo, en esta serie cabe destacar los compuestos **XVII** y **XVIII** (figura 28), los cuales presentan una fuerte unión a secuencias ricas en AT.

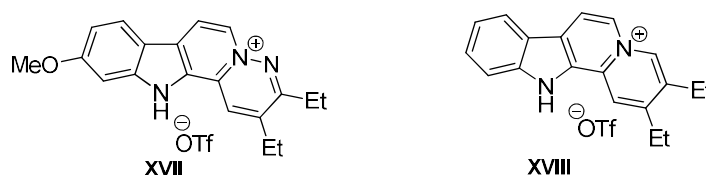


Figura 28. Estructura de los cationes **XVII** y **XVIII**

Mediante ensayos de relajación de plásmido, se observó que el compuesto **XVII** era intercalante ya que no solo fue capaz de relajar el plásmido, sino también de superenrollar el plásmido relajado. Por otro lado, sus curvas de desnaturalización muestran una escasa unión a secuencias ricas en GC con un aumento de la temperatura de desnaturalización de aproximadamente 2°C, mientras que se observa un aumento de la temperatura de aproximadamente 18°C con secuencias ricas en AT, lo que deja ver una interacción muy fuerte entre este ligando y estos oligonucleótidos.

En cuanto al compuesto **XVIII**, se observó que este no es capaz ni de relajar plásmidos superenrollados ni de enrollar plásmidos relajados por topoisomerasa I, lo que parecería indicar que no se trata de un compuesto capaz de intercalar ADN. Sin embargo, en los ensayos de desnaturalización térmica se observó que este ligando, aunque no se unía a secuencias ricas en GC, era capaz de aumentar la temperatura de desnaturalización de los oligonucleótidos

ricos en AT en más o menos 20°C, lo que está en contradicción con la aparente falta de intercalación demostrada en los ensayos de relajación de plásmido.

1.4.6.2.2. Derivados de azolodiazina

El estudio de esta serie de compuestos obtenidos a partir del núcleo de pirrolopirazina deparó resultados muy heterogéneos, por lo que resultó muy difícil establecer relaciones entre su estructura e interacción con el ADN. La única tendencia que se pudo establecer fue que el aumento de tamaño de los ligandos (pasar de 4 ciclos fusionados a 7) conlleva una interacción más fuerte con los oligonucleótidos, observándose un aumento en las temperaturas de desnaturalización de los mismos. En concreto cabe destacar el compuesto **XIX** (figura 29), que tiene preferencia de unión por secuencias ricas en AT, donde se alcanzó un aumento en la temperatura de desnaturalización de 60°C.

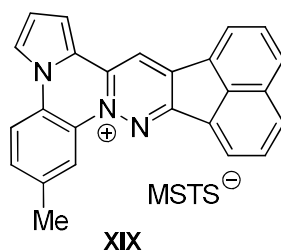


Figura 29. Estructura del catión XIX

1.4.6.2.3. Derivados de benzimidazol, piridoimidazol y benzotiazol

Se analizaron 14 compuestos catiónicos basados en estos núcleos, previamente sintetizados por condensación de Westphal usando como sustratos de partida las sales de cicloimonio derivadas de los heterociclos de partida y los compuestos dicarbonílicos correspondientes. En este caso, el estudio realizado puso de manifiesto que los compuestos basados en benzimidazol y piridoimidazol que poseen el sistema fenantreno en su estructura presentan, en general, mayor capacidad de unión al ADN que aquellos otros cromóforos que o bien no lo poseen o bien tienen en su estructura el sistema acenafteno o perileno (Figura 30). Por lo tanto, a la vista de estos resultados, parece que la presencia del grupo fenantreno confiere una mayor capacidad de interacción con el ADN.

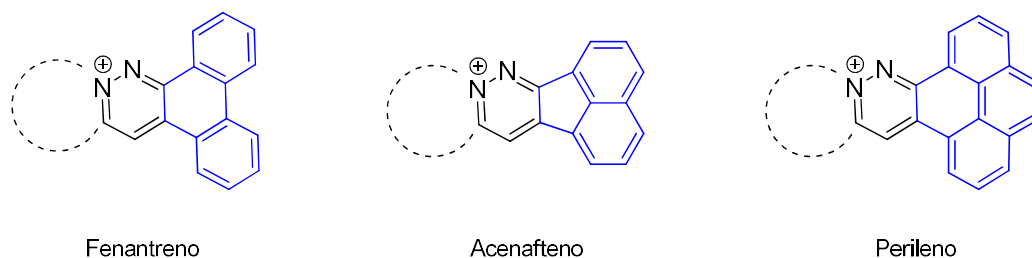


Figura 30. Cationes heteroaromáticos con los sistemas planos de fenantreno, acenafteno y perileno

Se observó también que la presencia de sustituyentes metoxilo y metilo en los derivados de benzotiazol (Figura 31) confieren al ligando una mayor afinidad por el ADN, como se demostró por el aumento de la temperatura de desnaturalización del ADN en presencia de estos compuestos sustituidos, en comparación con el ligando no sustituido.

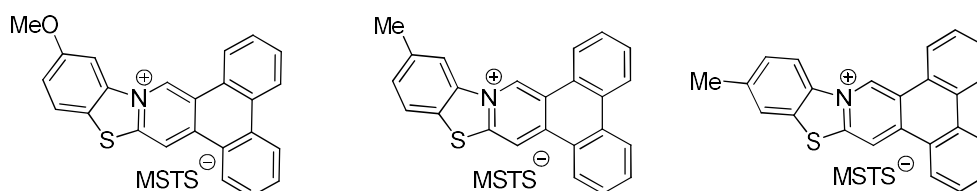


Figura 31. Derivados de benzotiazol con buena afinidad por el ADN

La mayoría de los compuestos presentan una mayor estabilización de secuencias ricas en AT observándose aumentos en la temperatura de desnaturalización del ADN, por lo tanto se observa que estos compuestos que se unen al ADN en esta serie lo hacen con preferencia por oligonucleótidos ricos en AT.

Del análisis de esta serie se logró determinar que el compuesto **XX** (figura 32) con una capacidad intercalante ya probada¹⁵⁶ era capaz de conseguir una estabilización muy alta de la secuencia de ADN tanto en oligonucleótidos ricos en AT como en GC, sin embargo presentó cierta preferencia por secuencias ricas en AT, como se observó con el incremento de la temperatura de desnaturalización del oligonucleótido (55°C). Este hecho sumado a la capacidad intercalante convierte a este compuesto en un candidato interesante sobre el cual obtener más información y realizar modificaciones estructurales.

Otro compuesto que demostró ser muy interesante fue el compuesto **XXI** (Figura 32), cuya capacidad intercalante ya estaba probada con anterioridad.¹⁵⁶ Tras los ensayos de

desnaturalización de ADN con este ligando, se concluyó que presentaba una interacción muy intensa con el ADN mostrando preferencia por oligonucleótidos ricos en AT. A estos hechos hay que añadir que se ha observado una alta fluorescencia cuando este ligando se encuentra formando un complejo con el ADN. Estas características convierten a este compuesto en un buen candidato para la realización de estudios posteriores y de modificaciones estructurales.

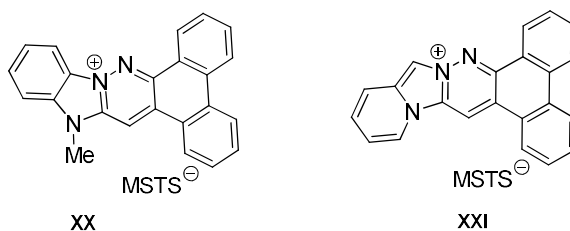


Figura 32. Estructura de los cationes **XX** y **XXI**

1.5. Ligandos que aumentan su fluorescencia tras intercalación (*light up probes*)

La detección y marcaje de biomacromoléculas como ADN o proteínas por sondas fluorescentes se ha convertido en una herramienta muy importante y necesaria en el campo de la bioquímica analítica y la medicina. Sin embargo, la mayoría de moléculas fluorescentes capaces de intercalar ADN muestran una desactivación de fluorescencia tras unirse al ADN debido a una reacción de transferencia de electrones fotoinducida en el estado excitado (PET).¹⁵⁷ Por esta razón, las moléculas capaces de aumentar su fluorescencia tras formar un complejo con el ADN (*light up probes* en inglés) son de gran interés ya que, de esta forma, la interacción de la sonda con la macromolécula diana puede ser seguida en tiempo real por la aparición de fluorescencia en la muestra.

Dos ejemplos de la utilidad de los colorantes fluorescentes tipo *light up* los encontramos en el marcaje de ADN, donde el ligando usado, bromuro de etidio, se usa para visualizar fragmentos de ADN en gel de poliacrilamida y la monitorización de la hibridación y renaturalización de una hebra de ADN con su hebra complementaria, en el cual se aprovecha el aumento de la intensidad de fluorescencia para seguir el proceso.³⁴

Los ligandos capaces de presentar cambios en su fluorescencia al unirse al ADN se pueden dividir en dos tipos: compuestos que presentan cambios en la distribución de carga en el

estado excitado y compuestos que presentan cambios conformacionales en el estado excitado. El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral se centra en el segundo tipo.

Hasta el momento se han desarrollado pocas estrategias sistemáticas para el diseño racional de sondas tipo *light-up*. Una de ellas, y la seguida en este trabajo, es dotar al ligando con sustituyentes que presenten libertad conformacional. Estas moléculas, en un medio de baja viscosidad, como puede ser el agua en la cual se encuentra disuelto el ADN, presentan una baja intensidad de fluorescencia debido a una desactivación no radiativa en el estado excitado de estas moléculas. Sin embargo, cuando estos ligandos se encuentran en un entorno más restrictivo, con un mayor impedimento estérico, como puede ser entre dos pares de bases cuando intercala el ADN, la desactivación no radiativa mediante la relajación torsional alrededor del enlace con el sustituyente se ve impedida. Esto se traduce en un aumento en la intensidad de fluorescencia del sistema debido a que la desactivación se llevará a cabo por vías radiativas, emitiendo fluorescencia.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ De esta manera, estos ligandos poseen una baja intensidad de fluorescencia intrínseca, pero cuando estos se encuentran entre los pares de base del ADN tras la intercalación presentan un aumento en su intensidad de fluorescencia.³⁴

En la bibliografía se encuentran pocos ejemplos de este tipo de ligandos en derivados catiónicos con nitrógeno cuaternario en posición cabeza de puente. Uno de ellos es el aminobenzoquinolizinio **XXII**,¹⁶¹ desarrollado en el grupo de Ihmels, compuesto muy poco fluorescente debido a la desactivación no radiante en el estado excitado por rotación alrededor del enlace C-NH₂. La intensidad de fluorescencia aumenta 33 veces tras la adición de ADN, siendo este aumento más notable para fragmentos de ADN ricos en AT.¹⁶¹ Otros ejemplos desarrollados por el mismo grupo de investigación son el *m*-clorofenilaminobenzoquinolizinio **XXIII**³⁴ y el *p*-dimetilaminofenilbenzoquinolizinio **XXIV**.¹⁵⁹ Ambos cationes aumentan su intensidad de fluorescencia, 50 y 38 veces respectivamente, tras la intercalación con una doble hebra de ADN de timo bovino (Figura 33). De los dos, el segundo fluoróforo es particularmente interesante, debido a que emite en la región del infrarrojo cercano lo cual es una propiedad deseable al tratarse de sondas fluorescentes con aplicaciones bioanalíticas, debido a la baja energía de la radiación en estas longitudes de onda.

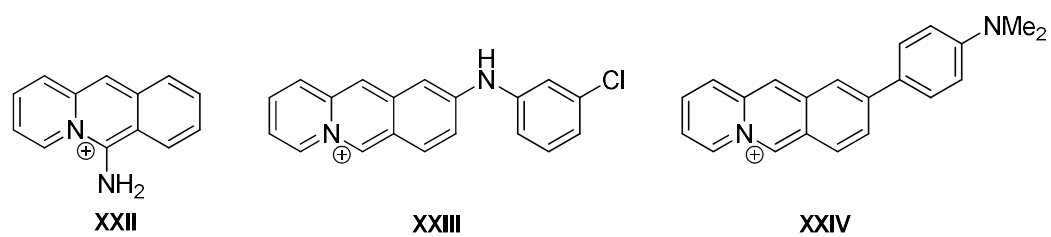


Figura 33. Ligandos intercalantes de ADN con sustituyentes con libertad conformacional (**XXIII** y **XXIV**)

2. Procesos Fotofísicos

La fluorescencia está basada en la emisión de fotones por parte de una molécula dada, que pasa de un estado electrónico excitado a los niveles vibracionales-rotacionales del estado electrónico fundamental de energía.

Desde que se describiera por primera vez este fenómeno hasta nuestros días, las técnicas basadas en la fluorescencia se han ido convirtiendo en herramientas fundamentales, altamente sensibles y no destructivas para ayudar al investigador a entender el comportamiento físico y químico de la materia.¹⁶² Estas técnicas pueden ir desde sencillas medidas de emisión en estado estacionario de una muestra en disolución hasta sofisticados experimentos de resolución temporal de imagen a nivel celular.

La fluorescencia es atractiva debido a su sensibilidad, selectividad y fundamentalmente al tiempo de vida del proceso. Por lo general el tiempo de vida media de una especie en el estado excitado es breve puesto que una molécula es capaz de disipar energía de muchas maneras para volver su estado fundamental. En el periodo de tiempo en el cual la molécula se encuentra en el estado excitado pueden darse distintos procesos que impliquen tanto a las moléculas excitadas como a las moléculas vecinas, los cuales pueden afectar a la emisión de fluorescencia, al rendimiento cuántico, al tiempo de vida media del estado excitado y a la polarización de la fluorescencia, por lo tanto se pueden estudiar por técnicas basadas en el fenómeno de la fluorescencia.

Para observar fluorescencia el sistema en estudio ha de tener grupos capaces de absorber radiación en la zona del UV-Vis para luego emitirla en forma de fotones desde el estado singlete excitado, por esto, el uso de estas técnicas quedaría restringido a determinados sistemas químicos, no obstante en ocasiones el cromóforo puede ser añadido al medio en el cual se encuentra la molécula de estudio en forma de sonda fluorescente o unido covalentemente como una etiqueta fluorescente, permitiendo el uso de estas técnicas en sistemas que no contengan grupos cromóforos intrínsecos.

Debido a esto la fluorescencia se puede aplicar a sistemas biológicos tales como ADN o proteínas.^{163, 164}

2.1. Procesos asociados a la luz

Al incidir una radiación electromagnética sobre una molécula se pueden dar diferentes respuestas que dependerán de la naturaleza de la molécula y del tipo de radiación incidente. Se puede producir un cambio en las propiedades de la radiación incidente dando lugar a la reflexión, refracción o dispersión de esta; o puede producirse la absorción de energía por parte de la molécula en cuestión de forma cuantizada. La energía absorbida puede dar lugar a dos tipos de procesos:

- Fotoquímico: La molécula pierde su estructura original.¹⁶⁵
- Fotofísico: La molécula asciende a un nivel energético superior conocido como estado excitado, regresando a su estado fundamental después de un tiempo sin haber sufrido cambio en su estructura química.¹⁶⁶

Este trabajo se centrará en los procesos fotofísicos. Cuando una radiación electromagnética de la zona UV-Vis del espectro incide sobre una molécula, se puede producir la desactivación de esta mediante dos tipos de procesos:

- No radiante: Las transiciones entre diferentes estados no implican la emisión o absorción de fotones.
- Radiante: La molécula pierde (o gana) energía de excitación por emisión (o absorción) de fotones.

Mediante el diagrama de niveles energéticos de Jablonski,¹⁶⁷ se pueden describir de manera sencilla los procesos fotofísicos (Figura 34). En este diagrama quedan representados los diferentes estados electrónicos singletes fundamental, primero y segundo como S_0 , S_1 y S_2 , respectivamente. En cada nivel electrónico hay subniveles de energía vibracional y dentro de estos se encuentran los subniveles rotacionales (no representados en el diagrama). Los estados electrónicos tripletes están representados por T_1 , T_2 ,... Las flechas solidas del diagrama hacen referencia a procesos radiantes siendo las punteadas las correspondientes a los procesos no radiantes.

La rapidez en el proceso de absorción transcurre con la suficiente rapidez (10^{-12} - 10^{-15} s) como para que no exista desplazamiento significativo de los núcleos (Principio de Franck-Codon), cosa que no ocurre con otros procesos del diagrama.

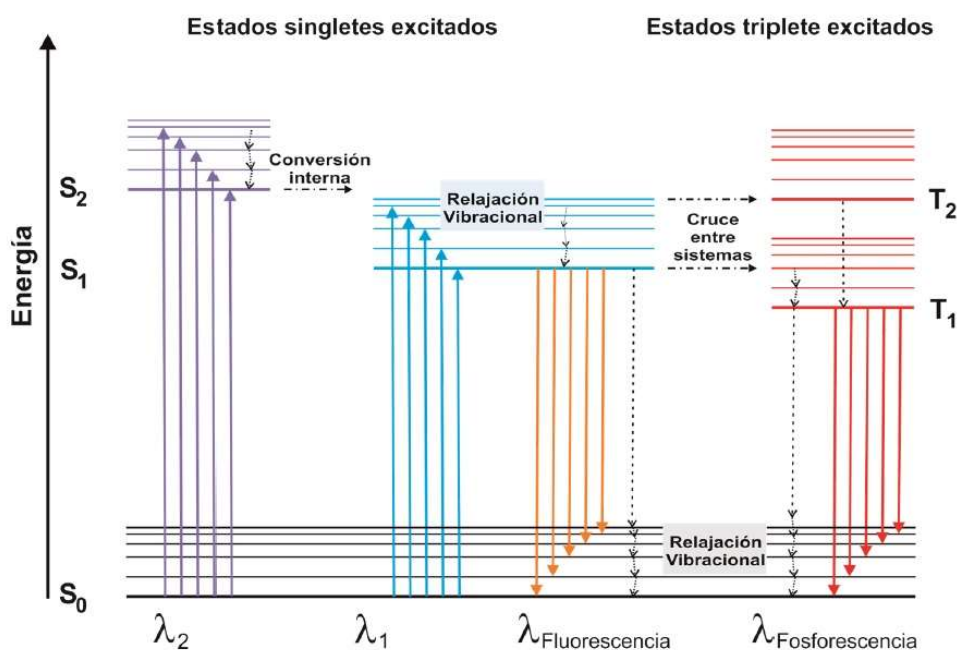
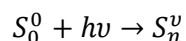


Figura 34. Diagrama de Jablonski: Representación esquemática de los diferentes procesos fotofísicos que pueden tener lugar tras la excitación inicial de una molécula

En los apartados siguientes se comentará con más detalle de los procesos representados en el diagrama.¹⁶⁸

2.1.1. Procesos de absorción

La excitación de una molécula cualquiera M , se realiza de forma discreta, es decir, cada molécula absorbe un fotón con el que se produce un tránsito energético representado como:



La velocidad en el proceso de absorción está definida por la cantidad de fotones absorbidos por unidad de tiempo y volumen, magnitud que coincidirá con la velocidad de desaparición de especies en el estado fundamental.

$$I_a = \frac{d[M]}{dt} = k[M]^*$$

Siendo M la molécula en estado fundamental y M^* la misma molécula en estado excitado S_n^v , I_a es la intensidad de luz absorbida por la molécula por unidad de tiempo y volumen. Cuando un rayo de luz monocromática de intensidad I_0 pasa a través de una sustancia capaz de absorber radiación uniformemente, la intensidad de luz transmitida I_t viene dada por la ley de Lambert-Beer.

$$I_t = I_0 10^{-\varepsilon c \ell}$$

En esta ecuación ε es la absorptividad molar expresada en $\text{cm}^{-1}\text{Lmol}^{-1}$, c la concentración de las especies capaces de absorber radiación expresadas en molL^{-1} y ℓ la longitud de la muestra atravesada por el rayo, también conocido como paso óptico expresado en centímetros.

$$I_a = I_0 - I_t = I_0(1 - 10^{-\varepsilon c \ell})$$

La magnitud habitualmente medida en absorbancia se define como:

$$A = \varepsilon c \ell$$

En un espectro de absorción la radiación absorbida corresponde a la zona del ultravioleta y del visible. Esta energía es adecuada para dar tránsitos entre estados electrónicos donde estén implicados los electrones más externos. Las moléculas que dan lugar a estas transiciones se caracterizan por presentar grupos cromóforos y por lo general disponen de sistemas aromáticos con o sin heteroátomos, como es el caso de este trabajo. Estas moléculas contienen electrones en orbitales π y/o en orbitales no enlazantes (n).¹⁶⁹ Las moléculas capaces de disipar energía de forma radiante son conocidas como fluoróforos y las transiciones implicadas en los procesos fotofísicos que tienen lugar en la región del espectro UV-Vis son del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$.

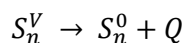
2.1.2. Procesos de desactivación unimoleculares

Una vez una molécula ha alcanzado el estado excitado esta se desactiva rápidamente debido a que no está en equilibrio con el medio y tiende a regresar al estado fundamental. El exceso de energía se puede liberar por distintas vías fotofísicas unimoleculares que pueden ser no radiantes o radiantes.¹⁶⁹

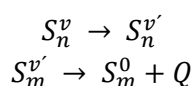
2.1.2.1. Procesos no radiantes

Son procesos en los que la energía de excitación se disipa en forma de calor

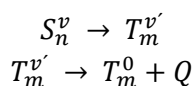
- **Relajación vibracional y rotacional:** Es un proceso exotérmico rápido ($\tau = 10^{-11}$ - 10^{-12} s) debido al choque entre moléculas. Corresponde a la transición entre los estados vibracionales excitados y el estado vibracional fundamental dentro del mismo estado electrónico.



- **Conversión Interna:** Ocurre al cruzarse dos curvas de potencial de dos estados electrónicos de igual multiplicidad. Existirán niveles rotacionales y/o vibracionales que pertenezcan a ambos estados, pudiéndose producir un fenómeno de conversión interna, este fenómeno también es muy rápido ($\tau = 10^{-11}$ - 10^{-14} s). Se trata de un proceso isoenergético el cual va acompañado de una relajación vibracional y rotacional que lo lleva al estado vibracional más bajo del estado electrónico final.



- **Cruce entre sistemas:** Proceso análogo a la conversión interna, pero que tiene lugar entre estados electrónicos de diferente multiplicidad. Es por ello que teóricamente es una transición prohibida, lo que origina que este proceso sea mucho más lento ($\tau = 10^{-7}$ - 10^{-11} s). Como en el caso anterior, es más probable que ocurra entre niveles de alta energía donde la diferencia energética entre estados es menor. También suele ir acompañado de una relajación rotacional y vibracional.

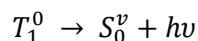


2.1.2.2. Procesos radiantes

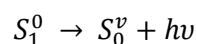
En este tipo de procesos existe emisión de fotones por parte de la molécula excitada al pasar al estado fundamental. Los procesos radiantes más importantes son la fosforescencia y la fluorescencia.

- **Fosforescencia:** Transición energética entre estados de diferente multiplicidad. Por lo general se produce desde el estado vibracional más bajo del estado triplete, T_1^0 , hasta los niveles vibracionales del estado singlete fundamental, S_0^V . Esta transición está prohibida tanto en absorción como en emisión, por lo que para que tenga lugar es

necesario que se dé un cruce entre sistemas. Por esta razón la fosforescencia es un proceso muy lento ($\tau = 10^2$ - 10^3 s) y para observarla es indispensable la inhibición de todos los procesos de desactivación más rápidos y que compitan con ella.



- **Fluorescencia:** Es una transición energética entre estados de igual multiplicidad. Se produce entre estados singlete, por lo general desde el nivel vibracional de menor energía del primer estado electrónico S_1^0 a los niveles vibracionales del estado fundamental S_0^v . Es una transición permitida por lo tanto es más rápida que la fosforescencia entre 10^{-7} - 10^{-10} s



Existen varios conceptos importantes relacionados con los procesos de desactivación en general, y particularmente con el de fluorescencia:¹⁶⁹

- Eficiencia o rendimiento cuántico
- Tiempo de vida media
- Despolarización o anisotropía de fluorescencia

La eficiencia o rendimiento cuántico de un proceso hace referencia al número de moléculas que se desactivan por dicho proceso con respecto al número total de moléculas activadas. En este caso, la eficiencia cuántica de fluorescencia sería el cociente entre el número de fotones emitidos por fluorescencia y el número de fotones absorbidos por la molécula en cuestión. Admitiendo únicamente la existencia de procesos unimoleculares de desactivación del estado excitado, se podría definir como:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{\sum_i k_i}$$

Se puede entender por tiempo de vida media de un estado excitado el tiempo medio que una molécula permanece en dicho estado antes de volver al estado fundamental. Este tiempo coincidirá con el inverso de la constante de velocidad del proceso de desactivación

unimolecular de ese estado. El tiempo de vida de un estado excitado que se desactiva por varios procesos unimoleculares será:

$$\tau = \frac{1}{\sum_i k_i}$$

En esta ecuación k_i es la constante cinética de cada uno de los procesos que producen la desactivación. El tiempo de vida depende en gran medida de las condiciones de la muestra tales como disolvente, pH, temperatura, presencia de sales, etc., denominándose tiempo de vida natural.

Los fluoróforos absorben preferentemente fotones con un vector eléctrico alineado de forma paralela al momento de la transición del fluoróforo.¹⁷⁰ Si la luz que incide sobre el fluoróforo está linealmente polarizada, se excitarán aquellas moléculas cuyo momento de la transición electrónica de absorción sea paralelo al vector eléctrico de la radiación de excitación. El ángulo relativo entre los momentos de excitación y emisión determina los conceptos anisotropía y polarización.

Existen diferentes causas que pueden provocar la despolarización de la fluorescencia, por ejemplo, la diferente orientación intrínseca que puedan tener los momentos de transición de excitación y de emisión en una determinada molécula, la transferencia de energía de excitación a otra molécula con una diferente orientación espacial, el movimiento browniano, la difusión rotacional, los cambios conformacionales, etc. Todos los procesos excepto el primero mencionado ocurren entre la excitación y la emisión de la radiación, es decir, durante el tiempo de vida del estado excitado y por tanto dependen de él. Los cambios en la orientación despolarizan la fluorescencia en mayor o en menor grado, es por esto que los valores de anisotropía y polarización son una medida de la cuantía de dichos procesos.¹⁷¹

No solo existen procesos de desactivación unimolecular sino que también existen otras formas de disipación de energía de un estado singlete excitado S_1 (o triplete excitado) que compiten con ellos y que implican la interacción de dos o más moléculas es el caso de la desactivación bimolecular o colisional. Estos procesos bimoleculares generalmente hacen disminuir la concentración de moléculas excitadas (o incluso en el estado fundamental son capaces de ser excitadas) y, como consecuencia, hay una disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia. Esta disminución puede utilizarse para cuantificar la extensión de estos procesos.¹⁶⁹

2.1.3. Procesos de desactivación bimoleculares

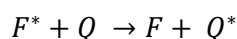
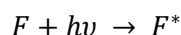
2.1.3.1. Desactivación o quenching

Es un proceso de desactivación no radiante de la fluorescencia debido a la interacción entre el fluoróforo (F) y otra molécula del medio llamada desactivador o *quencher* (Q). Es decir, cualquier proceso que haga disminuir la intensidad de fluorescencia de un cromóforo.

Este fenómeno ha sido muy estudiado dado que permite obtener información sobre la localización y accesibilidad de grupos cromóforos en un determinado sistema, sobre la difusión del cromóforo y desactivador, sobre la presencia o ausencia de complejos y sobre procesos de transferencia y/o migración de energía, etc.¹⁶⁴

En función del mecanismo de desactivación, se distinguen dos tipos de procesos de desactivación límite.¹⁷⁰

Desactivación dinámica: Tiene lugar si se produce una colisión efectiva entre el cromóforo excitado y el desactivador con la consecuente transferencia de energía al desactivador. Para que esto ocurra el desactivador debe difundir hasta el cromóforo y viceversa mientras el cromóforo se encuentre en el estado excitado, por lo tanto este proceso se rige por las leyes de difusión. El *quencher* en ese caso absorberá la energía aunque no necesariamente tiene que alcanzar el estado electrónico excitado. El proceso sigue un esquema de este tipo:



Este tipo de desactivación de fluorescencia está descrita por la ecuación de Stern-Volmer, la cual relaciona las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia de desactivador, o los rendimientos cuánticos de cada uno de los procesos, con la concentración de desactivador.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{S-V}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q]$$

En esta expresión I e I_0 son las intensidades de fluorescencia en presencia y ausencia de desactivador, Q , a una longitud de onda determinada, K_{S-V} es la constante de desactivación de Stern-Volmer, la cual es el producto de la constante cinética de desactivación bimolecular, k_q , por el tiempo de vida del cromóforo en ausencia de desactivador (τ_0) medido en las mismas condiciones experimentales; disolvente, temperatura, concentración, etc.

Una de las características de la desactivación dinámica y una de las mejores maneras de identificarla es que se debe cumplir esta expresión:¹⁶⁴

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau}$$

De este modo la ecuación de Stern-Volmer también se puede expresar en función de los tiempos de vida media por lo que los parámetros de esta ecuación se podrían obtener a través de medidas de la intensidad de fluorescencia en estado estacionario o la medida de los tiempos de vida media.

Este proceso de desactivación química se encuentra dominado por la difusión de las especies intervinientes, de aquí que, entre otros factores, aumente con la temperatura y disminuya con la viscosidad del disolvente y el tamaño de las especies que difunden.

Desactivación estática: El cromóforo y el desactivador forman un complejo no fluorescente en el estado fundamental por lo que este tipo de desactivación dependerá del equilibrio de formación-disociación de dicho complejo. Cuando este complejo absorbe luz inmediatamente regresa al estado fundamental sin emitir ningún fotón.

La desactivación se produce porque el desactivador “secuestra” un cromóforo libre del medio el cual dejará de originar fluorescencia. Aunque el cromóforo libre restante producirá fluorescencia sin modificar su tiempo de vida media, la intensidad de fluorescencia de la muestra se verá disminuida.

Este proceso se puede expresar mediante una ecuación de Stern-Volmer similar a la proporcionada por la desactivación dinámica.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S[Q]$$

Sin embargo, la constante de Stern-Volmer (K_S) en este caso es una constante de equilibrio y, por lo tanto, la desactivación estática dependerá de la estabilidad del complejo formado. Al tratarse la complejación de un proceso exotérmico, este aumento de temperatura desplaza el equilibrio hacia las formas libres disminuyendo así K_S . Al contrario que en la desactivación dinámica, en el caso de la desactivación estática disminuye con el aumento de la temperatura.

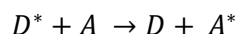
Una elevada densidad óptica (efecto interno, autoabsorción) y/o turbidez de la muestra puede ser también causa de una disminución de la intensidad de fluorescencia, aunque proporciona poca información a nivel molecular.

2.1.3.2. Transferencia de energía electrónica

Existen dos mecanismos por los que se puede transferir la energía de excitación: radiativos y no radiativos.

Reabsorción radiativa: Es un mecanismo en el cual un fotón es emitido y luego reabsorbido por el mismo sistema. Este proceso no disminuye el tiempo de vida media de fluorescencia y puede ser fácilmente minimizado disminuyendo la concentración de la muestra y cambiando las condiciones experimentales.

Transferencia de energía no radiativa: Son procesos de desactivación del estado excitado que implican la cesión de energía desde una molécula dadora excitada electrónicamente D^* , a otra molécula aceptora A según el siguiente proceso:



Los estados implicados en la transferencia de energía son los estados excitados de A y D, lo que hace a este mecanismo distinto del fenómeno de desactivación bimolecular. Las moléculasceptoras y dadoras pueden ser iguales o no y la transferencia puede producirse entre cromóforos de diferentes moléculas o dentro de la misma molécula.

Los procesos de energía pueden ocurrir por diferentes mecanismos.¹⁷² La interacción entre cromóforos puede ser de corto alcance, por solapamiento de orbitales tipo Dexter o de tipo culómbico de largo alcance tipo Förster. El mecanismo de transferencia de energía por resonancia tipo Förster (FRET) proporciona mucha información estructural sobre la muestra. Este proceso es debido a interacciones culómbicas de tipo dipolo-dipolo y la eficiencia del proceso depende, entre otros factores, del solapamiento entre el espectro de emisión del dador y el espectro de absorción del aceptor, de la orientación relativa de los momentos de la transición del dador y del aceptor y de la distancia entre ambos.

La transferencia de energía de excitación depende de la distancia entre las especies involucradas en esta transferencia de energía.⁹⁹ Se puede estudiar la proximidad en el espacio de dos hebras de ADN sintéticas en caso de que una de ellas llevase un cromóforo acoplado y la otra una molécula desactivante y de esta manera determinar si existe o no desnaturalización

de la doble hebra.⁶⁴ La distancia a la cual se puede observar el efecto FRET dependerá del cromóforo elegido como donador, a menor intensidad de fluorescencia, menor radio de Förster.⁹⁹

2.2. Aplicación de fenómenos de absorción a ligandos

Los fenómenos de absorción y fluorescencia se pueden usar en el estudio de las propiedades de unión de las sondas fluorescentes a ADN.³ La aparición de cambios en las bandas de absorción y emisión, ya sean en intensidad o en el máximo pueden dar indicios de una interacción entre ADN y la sonda de estudio.^{173, 174} Realizando una valoración en emisión y absorción se pueden obtener datos para establecer la constante de afinidad entre la sonda y el ADN,¹⁷⁵ utilizando la disminución debido a reacciones tipo PET entre la sonda y las bases nitrogenadas,³ o el aumento en la señal tras la formación del complejo.

2.2.1. Dicroísmo circular

Un método ampliamente utilizado para detectar y analizar la quiralidad de las moléculas consiste en la determinación de la actividad óptica de las mismas a través de la técnica de Dicroísmo Circular (CD). Esta técnica permite realizar una *observación quiral directa*, lo que quiere decir que con la simple obtención de una señal de CD se puede afirmar que el sistema en estudio presenta quiralidad. Esta técnica también sirve como *medida quiral*, que proporciona información acerca del tipo de transición espectroscópica que se produce y sobre configuraciones absolutas, indicios de cómo va a ser la configuración absoluta de las moléculas que tengan quiralidad conformacional o configuracional, sobre la elipticidad de cristales líquidos o películas poliméricas con quiralidad supramolecular o molecular, etc.¹⁷⁶

Esto permite su utilización en diferentes campos de la química, tanto para identificación, separación y obtención de configuraciones absolutas de moléculas orgánicas sencillas y como complemento a técnicas estructurales como la cristalografía de rayos X o RMN. Con esta técnica se puede obtener información sobre estructuras secundarias o terciarias de macromoléculas quirales de origen biológico como ADN y proteínas.¹⁷⁶

La señal obtenida por CD no siempre es debida a un grupo quiral o a una estructura con una orientación determinada, sino que se puede inducir en varios tipos de sistemas que no tienen elementos ópticamente activos como es el caso de las sondas fluorescentes presentadas en este trabajo. Este fenómeno se conoce como Dicroísmo Circular Inducido (ICD). El fenómeno

de ICD se puede producir, por ejemplo, cuando moléculas aquirales de bajo peso molecular interaccionan con macromoléculas con una orientación determinada, es este caso se induce quiralidad en la molécula de bajo peso molecular, la cual es detectada por esta técnica.

2.2.2. Fundamentos teóricos del Dicroísmo Circular

Una radiación electromagnética está formada por un campo eléctrico \vec{E} y uno magnético \vec{B} , iguales, perpendiculares entre sí y a la dirección de propagación y vibran en fase. Para caracterizar una radiación basta con determinar uno de los dos vectores \vec{E} o \vec{B} , puesto que conocido uno de ellos se conoce la existencia del otro con las características mencionadas.

La longitud de onda λ se define como la distancia recorrida por la radiación durante una oscilación completa de \vec{E} (\vec{B}), por ejemplo, la separación entre dos máximos o dos valles consecutivos de la onda asociada a cada uno de estos vectores.

Se conoce como plano de polarización de una radiación al plano en el que tiene lugar la oscilación del vector \vec{E} (\vec{B}).¹⁷⁷ Se puede considerar una radiación polarizada en un plano como la resultante de dos ondas circularmente polarizadas, una a la derecha (R) y otra a la izquierda (L) de igual intensidad.

Si esta radiación polarizada en un plano atraviesa la materia puede ocurrir que esta absorba una parte de ella. Esta absorción se relaciona con la absorptividad molar ϵ , la cual es característica de la muestra a una determinada longitud de onda.

Cuando este fenómeno ocurre, pueden darse dos casos:¹⁶⁹

- Que la muestra absorba por igual ambas componentes R y L, es decir, que las absorptividades molares sean iguales en los dos sentidos $\epsilon_R = \epsilon_L$. En estas condiciones la radiación transmitida tiene la misma intensidad en R que en L (aunque su intensidad total sea distinta de la radiación incidente) por lo que la radiación está polarizada en un plano y al girar describe un círculo (Figura 35) (a).
- Que la muestra absorba más una de las componentes que la otra, es decir, $\epsilon_R \neq \epsilon_L$. En este caso las componentes R y L de la radiación transmitida tendrán distinta intensidad, por lo que la resultante describe al girar una elipse, dando lugar a una radiación elípticamente polarizada. Se dice entonces que esta muestra presenta dicroísmo circular (Figura 35) (b).

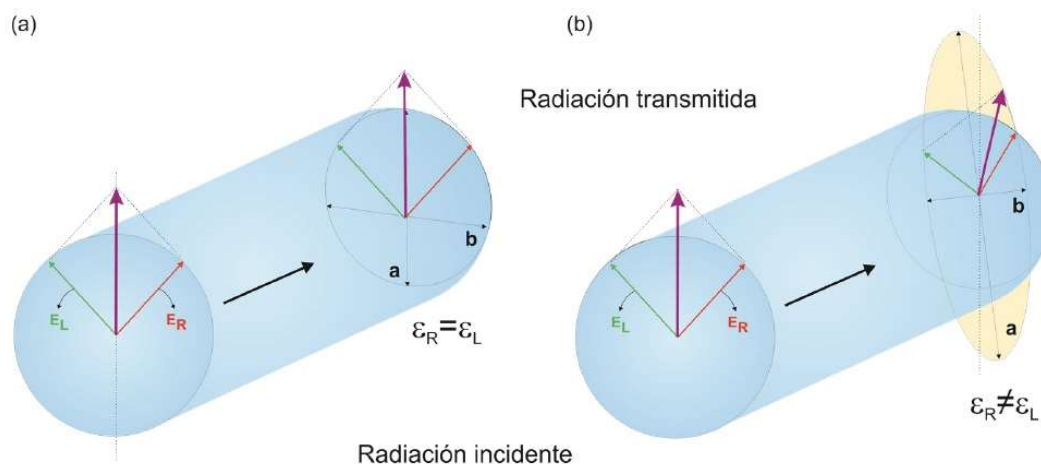


Figura 35. Radiaciones incidente y transmitida por una muestra donde $\epsilon_R = \epsilon_L$ (a) y $\epsilon_R \neq \epsilon_L$ (b)

A una longitud de onda dada, se define ΔA como la diferencia entre la absorbancia de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda y hacia la derecha:

$$\Delta A = (A_L - A_R)_\lambda$$

Si se aplica la ley de Lambert-Beer:

$$\Delta A = (\epsilon_L - \epsilon_R)_\lambda \ell C$$

Las medidas de dicroísmo circular suelen expresarse como *elipticidad* θ , la cual se define como:

$$\theta_\lambda = \arctan(b/a)$$

En esta expresión, a y b son los ejes mayor y menor de la elipse de la radiación transmitida, respectivamente. La elipticidad θ expresada en grados es función de la longitud de onda, de la concentración de soluto y del paso óptico de luz. Sin embargo, esta dependencia puede ser eliminada definiendo la elipticidad molar $[\theta]$ que se expresa en grados $\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$, y para una determinada longitud de onda:

$$[\theta]_\lambda = 100\theta_\lambda / \ell C$$

La diferencia de coeficientes de extinción molar ($\varepsilon_L - \varepsilon_R$), y la elipticidad molar $[\theta]$, están relacionadas mediante la expresión:

$$[\theta]_\lambda = 3298.2\Delta\varepsilon_\lambda$$

Se dice que el dicroísmo es positivo cuando $\Delta\varepsilon_\lambda > 0$ y negativo en caso contrario. Cabe enfatizar que tanto θ , como $[\theta]$ y $\Delta\varepsilon$ dependen de la longitud de onda de la radiación utilizada. Una representación gráfica de cualquiera de ellas frente a la longitud de onda constituye un espectro de dicroísmo circular.¹⁷⁸

2.2.3. Dicroísmo circular aplicado a Complejos Ligando/ADN

Como se ha mencionado previamente, la aparición de una señal de dicroísmo circular inducido en una muestra donde se encuentra una sonda y ADN a la longitud de onda de absorción de la sonda confirma que hay una interacción entre dicha sonda y la molécula de ADN. Aparte de este dato, también se puede obtener información acerca de la posición de la sonda en el complejo con el ADN dado que la intensidad y la fase de la señal de ICD dependen de la posición y la orientación relativas del cromóforo con respecto a los pares de base del ADN.

Por lo general, un intercalante tiene una señal de ICD negativa débil cuando el momento de la transición se encuentra polarizado a lo largo del eje mayor del bolsillo de unión (paralelo al bisector del par de bases). Por otro lado, una señal positiva de ICD relativamente intensa aparecerá cuando el momento de la transición se encuentra polarizado perpendicularmente al eje mayor del bolsillo de unión.

Las moléculas que se unen al surco del ADN dan señales de ICD positivas aún más intensas que las mencionadas anteriormente.³

3. Síntesis de cationes heteroaromáticos tipo azonia

El término *azonia* se usó por primera vez por Bradsher en 1965.¹⁷⁹ Fue usado para referirse a heterociclos aromáticos en los cuales se había sustituido un carbono cabeza de puente por un nitrógeno cuaternario en la misma posición. Nuestro grupo propuso la denominación de “*azonia aromatic heterocycles*” (AZAH)¹⁴ para referirse a esta familia de cationes heteroaromáticos.

El ejemplo más sencillo y representativo de este tipo de heterociclos es, como ya se ha indicado, el sistema de pirido[1,2-*a*]piridinio (Figura 36), más conocido como quinolizinio, que desde que se describió su primera síntesis por Boekelheide y Gall en 1954¹⁸⁰ ha atraído el interés debido a que, como se ha mencionado, se encuentra presente en numerosos alcaloides naturales como la coralina, la familia de la berberina, la sempervirina, etc.

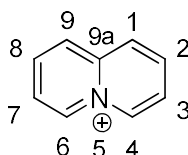


Figura 36. Estructura del quinolizinio (pirido[1,2-*a*]piridinio)

La fusión del sistema de quinolizinio con uno o dos anillos bencénicos adicionales da lugar a la generación un total de 3 benzo-, 6 dibenzo- y 10 naftoquinolizínios. Hasta 83 estructuras pentacíclicas isómeras que contengan el sistema de quinolizinio se pueden generar con la fusión con tres anillos bencénicos.¹⁸¹ Los derivados no benzenoides como el imidazopiridinio y los derivados de diazaquinolizinio también se incluyen en este tipo de heterociclos.

Los métodos usados para la formación de heterociclos se pueden catalogar en base al tipo de reacción empleada para la síntesis de los mismos. En este caso, para la síntesis de sales de quinolizinio y análogos, las reacciones más importantes empleadas¹⁴ se pueden agrupar en 3 tipos principales:

- Reacciones de formación de anillo basadas en activación de enlaces C-H
- Reacciones de metátesis de cierre de anillo (RCM)
- Condensación de Westphal

A continuación, se describen estas tres estrategias sintéticas. La mayoría de los ejemplos seleccionados son referentes al quinolizinio pues, como se ha comentado, es el ejemplo de catión tipo azonia que más atención ha atraído. Sin embargo, como se mostrará, varias de estas estrategias sintéticas son válidas también para otros derivados policíclicos con un nitrógeno en posición cabeza de puente.

3.1. Reacciones de formación de anillo basadas en la activación de enlaces C-H

Los métodos clásicos para conseguir la funcionalización de enlaces C-H no activados eran procesos radicalicos en los cuales la selectividad se conseguía, en algunos casos, por la distinta fortaleza en el enlace C-H o por una abstracción intramolecular de hidrógeno.^{182, 183} Sin embargo, los avances conseguidos en el campo de la química organometálica han propiciado nuevas estrategias de funcionalización con una mayor regioselectividad. Las primeras aproximaciones se centraron en el desarrollo de métodos para la funcionalización de enlaces C-H en hidrocarburos relativamente sencillos,¹⁸⁴ no obstante, con el paso del tiempo este campo ha evolucionado hasta el punto en el cual puede ser considerado como una estrategia alternativa a las tradicionales para construir sistemas cíclicos.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷

Los métodos para la formación de heterociclos policíclicos a través de la formación de enlaces C-Y (Y = C, N y O) son de vital importancia para la síntesis de moléculas bioactivas y fármacos y otras con aplicaciones en el campo de materiales. Además, los métodos que consiguen este objetivo funcionalizando directamente el enlace C-H son muy atractivos puesto que evitan la prefuncionalización de los sustratos y de esta manera se mejora la economía atómica del proceso.

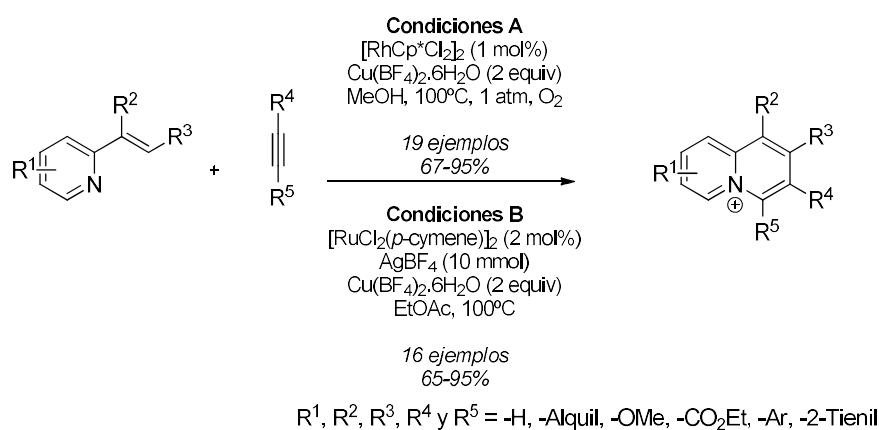
Recientemente se ha observado que la activación de enlaces C-H usando metales de transición es un método muy prometedor para la formación de enlaces carbono-carbono o carbono heteroátomo.¹⁸⁵ Más concretamente los complejos de Ru(II) y Rh(III) han demostrado tener mucho potencial para la síntesis de carbo o heterociclos mediante reacciones de ciclación.

3.1.1. Activación C(sp²)-H

En el año 2008, Jones y su equipo desarrollaron un nuevo método para sintetizar sales de isoquinolinio y quinolizinio usando 2-fenilpiridina, *N*-bencilidenmetilamina y

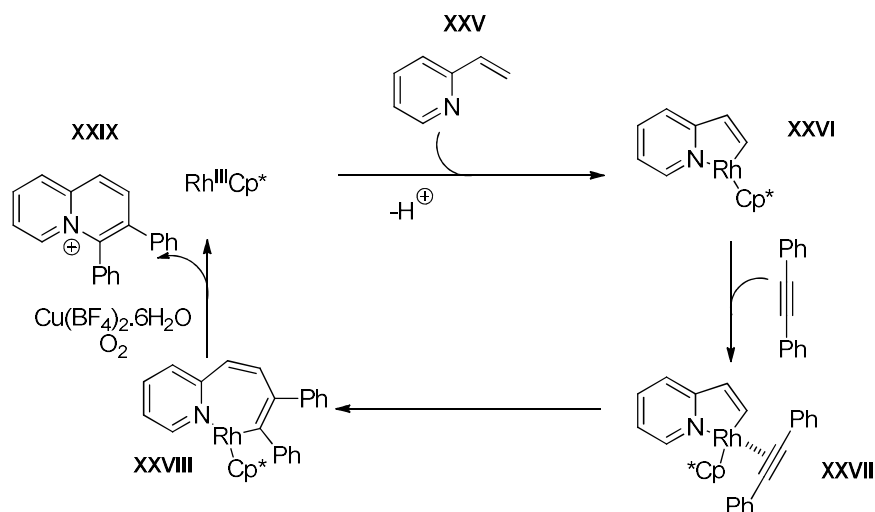
dimetilacetilendicarboxilato (DMAD). Esta reacción se lleva a cabo mediante la activación de enlaces C-H catalizada por Rh y requiere una cantidad estequiométrica de $[\text{RhCp}^*\text{Cl}_2]_2$.¹⁸⁸

Inspirado por el trabajo de Jones, Cheng y colaboradores desarrollaron una metodología eficiente para la síntesis de quinolizínios di-, tri- y tetrasustituidos. Utilizando como productos de partida 2-vinilpiridinas y distintos alquinos, mediante una activación de enlaces C-H catalizado por complejos de Rh(III) o Ru(II) se consigue la formación de los enlaces C2-C3 y C4-N5 y de esta manera la formación del heterociclo.¹⁸⁸ Las reacciones fueron llevadas a cabo en presencia de 1 mol% de $[\text{RhCp}^*\text{Cl}_2]_2$ y 0.5 equivalentes de $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, en metanol, a 60°C y en atmosfera de O_2 ; o bien usando 2 mol% de $[\text{RuCl}_2(p\text{-cymene})]_2$ como catalizador en presencia de $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{AgBF}_4$, en acetato de etilo y a 100°C (Esquema 1).



Esquema 1. Síntesis de sales de quinolizínio mediante la activación de enlaces C-H en 2-alquénipiridinas empleando Rh(III) o Ru(II) como catalizadores

Los autores hacen una propuesta mecanística según la cual el primer paso consistiría en la coordinación entre la vinilpiridina y el centro metálico del complejo de rodio seguida de la activación del enlace C-H del vinilo formando un ciclo de 5 miembros con el rodio. La coordinación del alquino al complejo XXVI generaría el intermedio XXVII y la consiguiente inserción del alquino entre el enlace Rh-C daría como resultado el ciclo de 7 miembros XXVIII. Finalmente, por eliminación reductora del compuesto XXVIII se obtendría el quinolizínio correspondiente XXIX (Esquema 2).



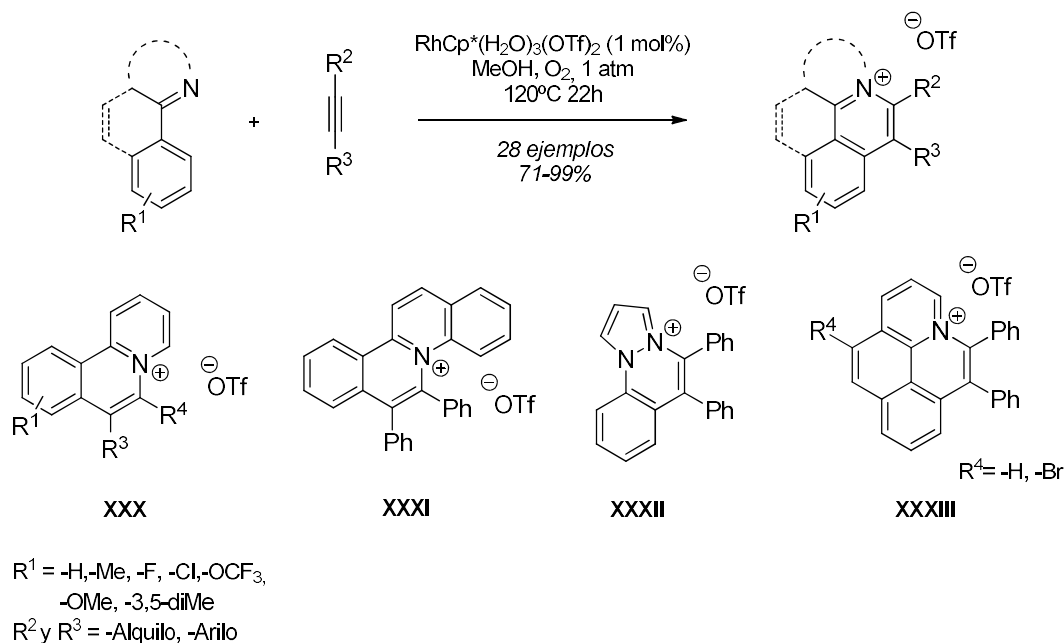
Esquema 2. Mecanismo propuesto para la formación de sales de quinolizinio

En líneas generales, las reacciones catalizadas por los complejos de Ru(II) y Rh(III) llevadas a cabo por Cheng funcionaron bien, sin embargo, los sistemas en los que se usó Ru(II) en presencia de alquil-aril y dialquilalquinos mostraron muy baja reactividad. En cualquier caso, los sistemas de rodio y rutenio mostraron reactividad complementaria y se necesitaron cantidades estequiométricas de sales de cobre y plata como oxidantes para que la reacción no se detuviese, lo que conlleva una baja economía atómica.

En el año 2013 Huang y colaboradores, intentando mejorar la baja economía atómica demostrada por Cheng ese mismo año, decidieron cambiar las condiciones de reacción. La síntesis de sales de benzo[*a*]quinolizinio propuesta por Huang está basada en la reacción de arenos y alquinos mediante un proceso de activación oxidativa de enlaces C-H en presencia de un catalizador de Rh(III) y la posterior formación del ciclo.¹⁸⁹

Al optimizar las condiciones de reacción, se observó que el mejor candidato para catalizar la misma era $\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OTf})_2$ (0,2 mol %) y que, para que la reacción transcurriese con altos rendimientos, era necesario la presencia de un ácido. La mejora más significativa observada con respecto a la propuesta de Cheng en este proceso es la ausencia de sales de cobre o plata, ya que emplea el oxígeno ambiental como oxidante. Un estudio mecanístico llevado a cabo que condujo al aislamiento y caracterización del complejo de rodio implicado demostró que la oxidación de Rh(I) a Rh(III) se consigue de manera sencilla en presencia de oxígeno y medio ácido.

Este método permitió la síntesis de otros sistemas aromáticos con nitrógeno cabeza de puente tales como dibenzo[*a,f*]quinolizinio (**XXXI**), pirazolo[1,2-*a*]cinolinio (**XXXII**) y nafto[2,1,8-*ija*]-quinolizinio (**XXXIII**). (Esquema 3)



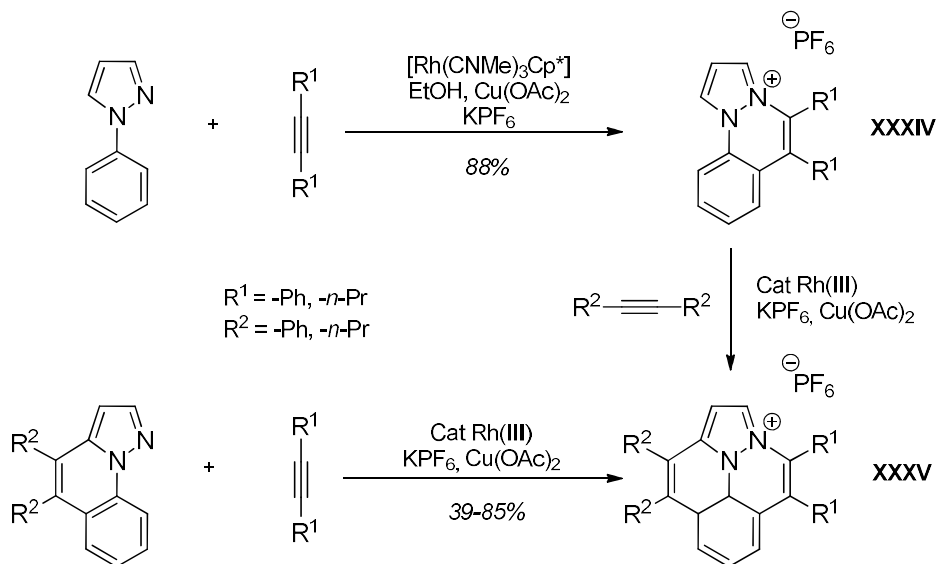
Esquema 3. Síntesis de sales de dibenzo-, pirazolo- y naftoquinolizinio

Davies y Macgregor¹⁹⁰ realizaron un estudio mecanístico de la reacción de 1-fenilpirazol, 2-fenilpiridina y 2-vinilpiridina con difenilacetileno y 4-octino. En este estudio se observó que la reacción transcurría mediante la activación inicial del enlace C-H, inserción del alquino y un acoplamiento reductor.

Tanto resultados experimentales como estudios computacionales han mostrado como estas reacciones pueden verse afectadas por el tipo de sustrato y las condiciones de reacción. El 1-fenilpirazol fue el único sustrato capaz de formar compuestos tetracíclicos catiónicos al reaccionar con dos equivalentes de alquino (Esquema 4).

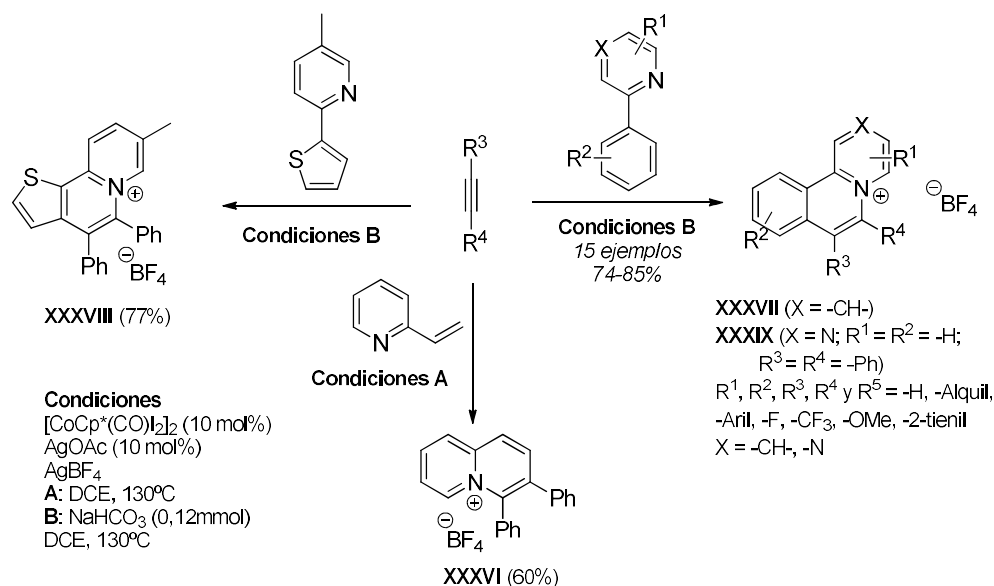
Cabe destacar que esta reacción es muy sensible a cambios en el disolvente, produciendo enlaces C-C o C-N en función del disolvente usado. En etanol se forma el pirazolo[1,2-*a*]cinolinio (**XXXIV**) mientras que en xileno se forma el producto del acoplamiento C-C. El compuesto **XXXIV** es el precursor del 9b-aza-2a-azoniciclopenta[*c,d*]fenaleno **XXXV** el cual

también puede ser obtenido a partir del sustrato sintetizado con el acoplamiento C-C alternativo.^{191, 192}



Esquema 4. Síntesis de los sistemas de pirazolo[1,2-*a*]cinolinio y 9b-aza-2a-azoniaciclopenta[*c,d*]fenaleno

Otro ejemplo de la utilidad de la estrategia [4+2] para la síntesis de cationes heteroaromáticos con nitrógeno cabeza de puente y sales de azinio es el propuesto también por Cheng¹⁹³ y colaboradores, los cuales han descrito una reacción de ciclación oxidativa catalizada por cobalto usando como sustrato 2-vinilpiridinas, 2-aryl y 2 heteroarylazinas con alquinos. Las reacciones condujeron a la formación de las correspondientes sales de quinolizinio (**XXXVI**), benzo[*a*]quinolizinio (**XXXVII**), tieno[2,3-*a*]quinolizinio (**XXXVIII**) y pirazino[2,1-*a*]isoquinolinio (**XXXIX**). (Esquema 5)



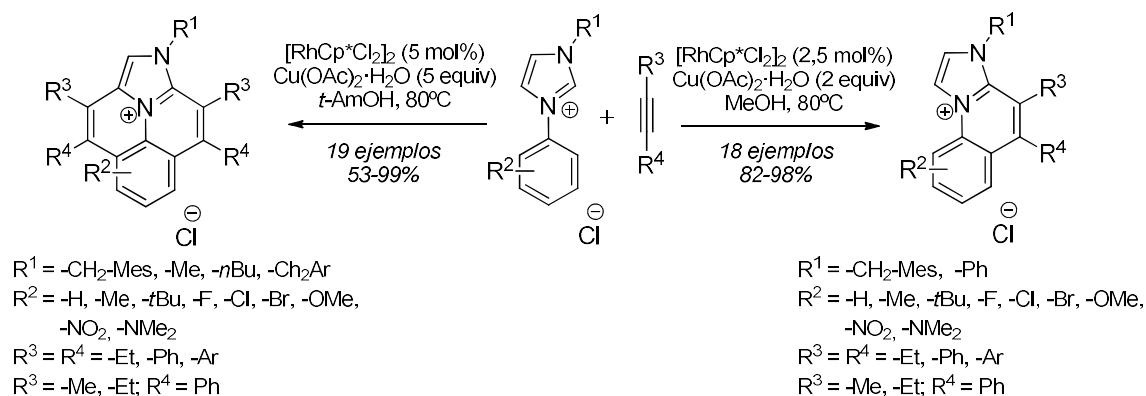
Esquema 5. Síntesis de sales de benzo- y tienoquinolizinio y pirazino[2,1-*a*]isoquinolinio

También se ha demostrado el comportamiento de los carbenos *N*-heterocíclicos (NHC) como grupos directores en la activación de enlaces C-H aromáticos. El grupo de Choudhury y Ghorai¹⁹⁴ ha puesto de manifiesto esta característica, la cual ha permitido la síntesis de diversos sistemas heterocíclicos a partir de sales de imidazolio y benzimidazolio y alquinos en condiciones suaves. En los estudios mecanísticos realizados consiguieron aislar y caracterizar el intermedio carbeno *N*-heterocíclico ciclometalado con Rh(III). El aislamiento avala la formación de un sistema tricíclico en donde se ve involucrada la activación de un enlace C-H aromático dirigida por un carbeno *N*-heterocíclico seguida de la inserción del alquino, formación de anillo, eliminación reductora y la regeneración oxidativa del catalizador.

Wang¹⁹⁵ y colaboradores, en la misma línea que el trabajo de Choudhury, publicaron una metodología para la síntesis de heterociclos aromáticos con nitrógeno cabeza de puente, valiéndose de la utilización de carbenos *N*-heterocíclicos como grupo dirigente en la activación de enlaces C-H.

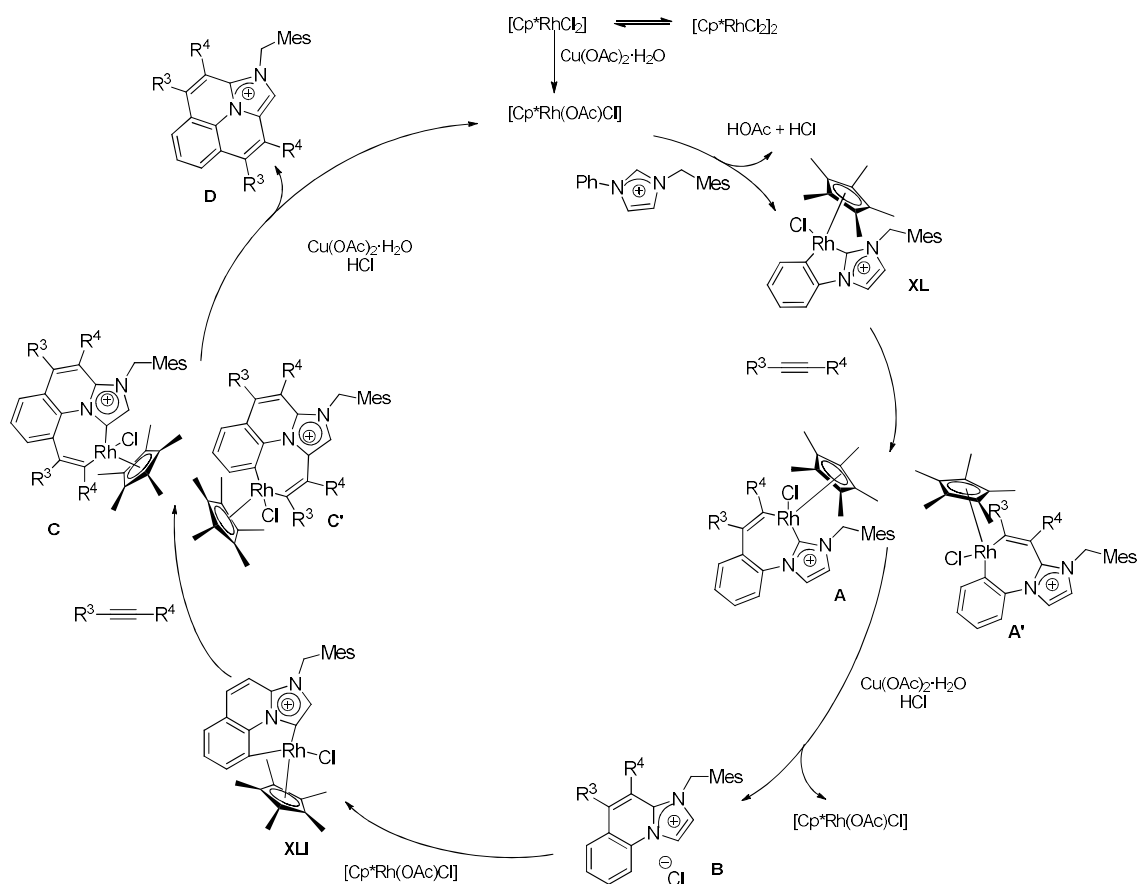
En este caso se utiliza como sustrato arilimidazolio y uno o dos equivalentes del alquino. El uso de $[\text{Cp}^*\text{RhCl}_2]_2$ y $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ da como resultado la formación de uno o dos nuevos ciclos en la molécula y dependiendo del empleo de 1 o 2 equivalentes del alquino se genera en presencia del catalizador uno o dos ciclos en la molécula. Las reacciones con este tipo de

sustratos transcurren con buenos rendimientos y son bastante regioselectivas en caso de trabajar con alquinos diferentemente sustituidos. (Esquema 6).



Esquema 6. Síntesis de sales de azoloquinolinizinio

En los estudios mecanísticos realizados, se han conseguido aislar dos intermediarios catalíticos que difieren de los hallados por el grupo de Choudhury. Basándose en estos intermediarios han desarrollado una propuesta mecanística para esta reacción. Según la misma, esta reacción transcurriría con la activación del enlace C-H dirigido por el carbeno *N*-heterocíclico, que conduce a la formación de un ciclo de 5 miembros con rodio (**XL**) (Esquema 7). A este paso le seguiría la inserción del alquino expandiendo el rodaciclo a 7 miembros. Posteriormente, se produce la reacción con $Cu(OAc)_2 \cdot H_2O$ y HCl para dar la eliminación reductora, formando el nuevo anillo en la molécula y regenerando el catalizador de $Rh(III)$. En el compuesto resultante volvería a haber una activación del enlace C-H, dirigido por el carbeno *N*-heterocíclico a la otra posición susceptible de ser activada, dando una vez más, un ciclo de 5 miembros con rodio (**XLI**). En este ciclo se produciría una inserción del alquino y la siguiente eliminación reductora regenerando el catalizador y se obtendría la molécula deseada.



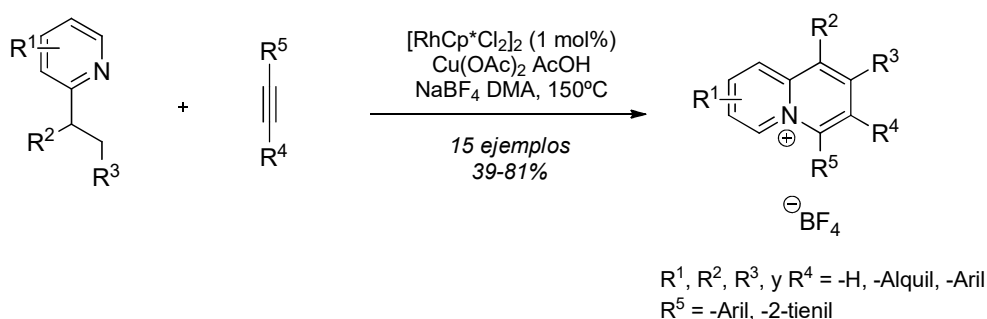
Esquema 7. Propuesta mecanística para el ciclo catalítico en la activación C-H mediada por carbenos *N*-heterocíclicos

En un estudio posterior se obtuvieron las sales de benzo[*ij*]imidazo[2,1,5-*d,e*]quinolizinio mediante una doble formación de anillo con rendimientos de medios a buenos usando Ru(II) como catalizador. Las reacciones transcurrieron con buena regioselectividad para alquinos diferentemente sustituidos, y se consiguieron los productos en los que solo se forma un anillo utilizando menos cantidad de catalizador de rutenio.¹⁹⁶

Los mismos autores describieron la reacción de arilpiridinos con alquinos catalizada por Rh(III). Se obtuvieron las sales sustituidas de benzo[*c*]quinolizinio y de benzo[*ij*]-pirido[2,1,6-*de*]quinolizinio mediante activación múltiple de enlaces C-H catalizada por rodio en un proceso one-pot.¹⁹⁷

3.1.2. Activación C(sp³)-H

En las últimas décadas, se han hecho grandes avances en la funcionalización de C(sp²)-H. Como se ha visto hasta ahora, el Rh(III) se ha usado para catalizar la activación de este tipo de enlaces para dar reacciones de ciclación. Las reacciones de ciclación implicando la activación de enlaces C(sp³)-H, en cambio, son menos habituales. Cheng y colaboradores han propuesto una estrategia [4+2] para la obtención del anillo de quinolizino usando 2-etilpiridinas en lugar de 2-alquenilpiridinas, un alquino no terminal y un catalizador de Rh(III) en presencia de una sal de cobre.¹⁹⁸



Esquema 8. Síntesis de sales de quinolizino, benzo[c]quinolizino y pirido[1,2-*a*]benzimidazolio por activación cooperativa de C(sp³)-H y C(sp²)-H

Se ha observado que esta reacción tiene mejores resultados si el alquino se encuentra sustituido con grupos electrodonadores. En este trabajo se hicieron pruebas para ver como afectaba la sustitución de la 2-etilpiridina, observándose una buena regioselectividad en la reacción en función del impedimento estérico del sustituyente (Esquema 8).

Como se ha visto, hasta ahora esta estrategia sintética permite el acceso a diversos sistemas policíclicos con nitrógeno cuaternario en posición cabeza de puente en pocos pasos de reacción y con buenos rendimientos y, con el paso del tiempo, la metodología ha ido mejorando hasta conseguir una buena economía atómica. Se ha observado que no solo se pueden activar enlaces C-H con carbonos sp² sino que también es útil para la activación de estos enlaces con carbonos sp³. La estrategia aquí descrita es muy versátil, aunque presenta como desventaja el uso de catalizadores metálicos y la presencia necesaria de grupos directores en la molécula para que se produzca la reacción, lo cual limita su aplicación a

sustratos concretos. En los casos donde no se tenga el sustrato adecuado o un catalizador selectivo se hace necesario buscar alternativas para obtener los productos deseados.

3.2. Reacciones de metátesis de cierre de anillo (RCM)

La metátesis de olefinas es una reacción muy extendida en el campo de la química sintética. Esta reacción implica la redistribución de fragmentos de alquenos por escisión y la posterior regeneración de los dobles enlaces carbono-carbono. La reacción necesita de la presencia de catalizadores. Es una reacción con una gran importancia en el campo de la química sintética por su versatilidad y su alcance. En 2005 Yves Chauvin, Robert H. Grubbs y Richard R. Shrock recibieron el premio Nobel en Química por la elucidación del mecanismo de reacción y el descubrimiento de una gran variedad de catalizadores altamente activos.^{199,200 201, 202}

La figura 37 muestra algunos de los catalizadores más ampliamente utilizados²⁰⁰ implicando metales como molibdeno o rutenio. Aunque algunos complejos con otros metales también son capaces de promover la reacción de metátesis (tungsteno,^{203, 204} renio²⁰⁵ y osmio²⁰⁶), estos presentan una menor estabilidad y/o reactividad y no han sido tan empleados.

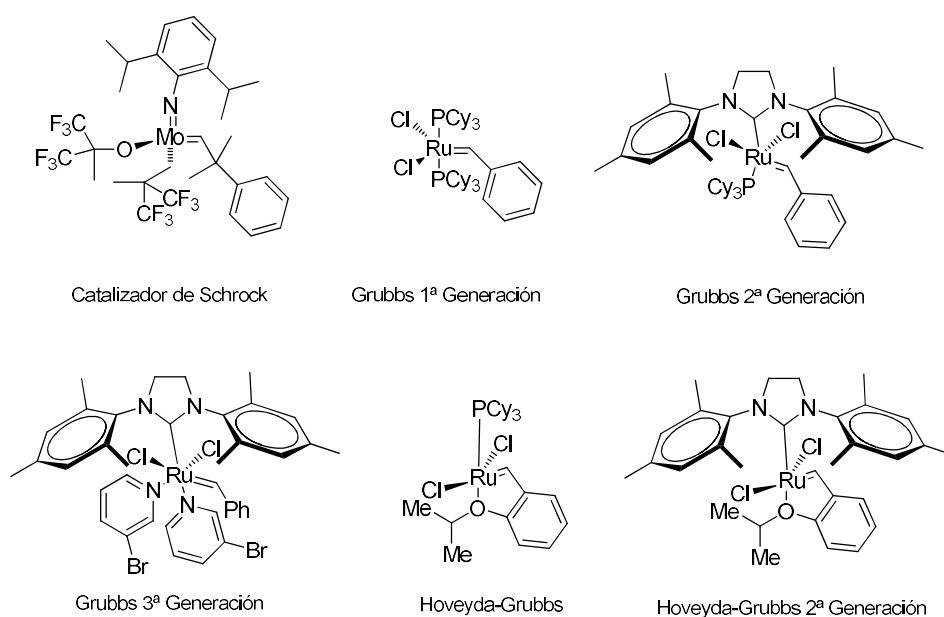


Figura 37. Algunos catalizadores usados en la reacción de metátesis olefínica

Las principales reacciones de metátesis se puede clasificar en tres categorías (figura 38):²⁰⁰

- Metátesis cruzada
- Metátesis de cierre de anillo
- Metátesis de apertura de anillo

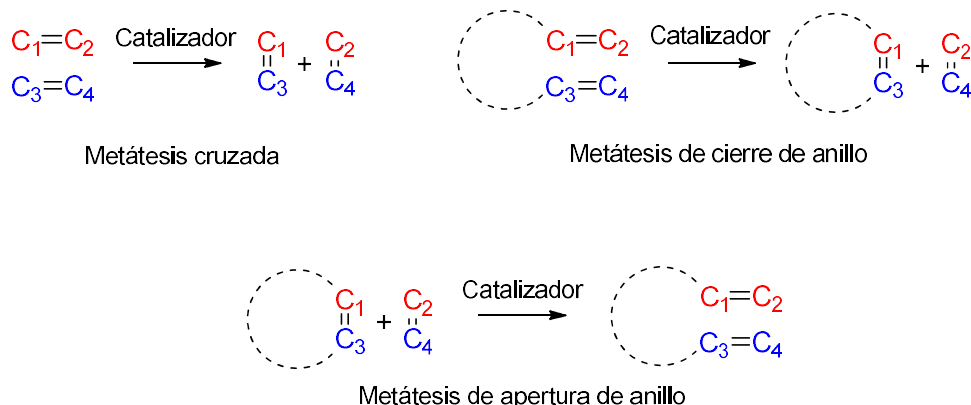
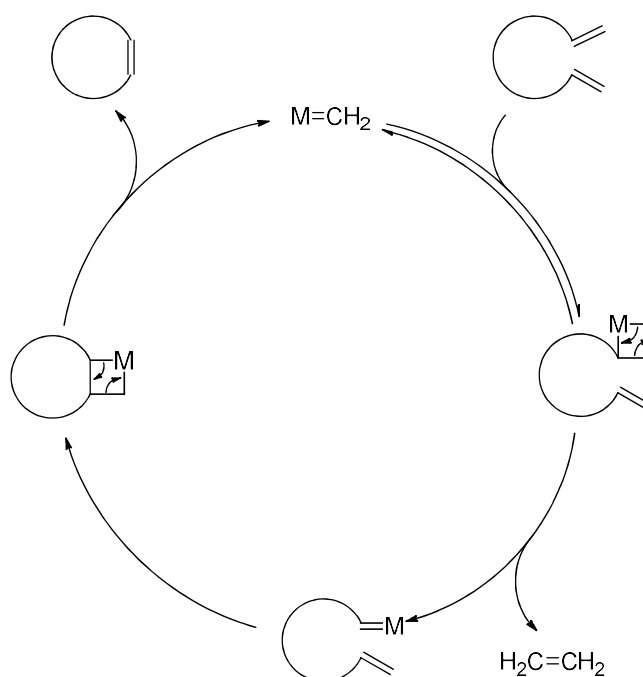


Figura 38. Tipos de reacciones de metátesis de olefinas

La metátesis de cierre de anillo (RCM) es actualmente una de las metodologías más ampliamente utilizada para la síntesis de carbo- y heterociclos.^{200, 207} En este caso, dos alquenos terminales reaccionan con el catalizador para generar una olefina cíclica liberando una olefina más pequeña, por lo general etileno, como producto secundario, lo que impide que la reacción sea reversible dado que este producto se elimina del medio de reacción como gas.

El ciclo catalítico (Esquema 9) consiste en una fase de iniciación (generación del complejo activo) y una fase de propagación (el complejo activo promueve ciclos adicionales). La catálisis empieza por una metátesis cruzada entre un carbeno activo ($M=CH_2$) y uno de los dos sustratos de olefinas para generar un metalociclobutano. Este ciclo puede revertir al sustrato de partida y a $M=C$ o pueden romperse los otros dos enlaces en el ciclo dando lugar a un compuesto donde el metal está incluido en la molécula de partida. En el siguiente paso se forma otro metalociclobutano donde su desintegración da como resultado $M=CH_2$, el cual actúa como catalizador activo en la fase de propagación. Lo que impulsa la reacción es que el catalizador activo $M=CH_2$ no reacciona con el producto de la metátesis, con lo cual la reacción no es reversible.



Esquema 9. Ciclo catalítico en la reacción de metátesis de cierre de anillo

Fu y Grubbs²⁰⁸ demostraron en 1992 la viabilidad de usar la reacción de metátesis de cierre de anillo en la síntesis de heterociclos, en este caso para heterociclos con oxígeno. Se observó que las reacciones transcurrían dando los productos deseados, usando como sustrato éteres alílicos y 5 mol% de catalizador a 20°C. Más tarde ese mismo año Fu y Grubbs²⁰⁹ describieron por primera vez la aplicación de esta estrategia para sintetizar una amplia variedad de heterociclos con nitrógeno como pirrolidinas, tetrahidropiridinas y tetrahidroazepinas (Figura 39). Hasta ese momento la obtención de estos derivados había sido problemática usando como sustratos aminas y amidas olefínicas. Este trabajo seminal abrió la puerta a una importante estrategia sintética para obtener heterociclos mediante una ciclación intramolecular, gracias a la cual se ha conseguido preparar una gran variedad de heterociclos usando condiciones suaves.²⁰⁷

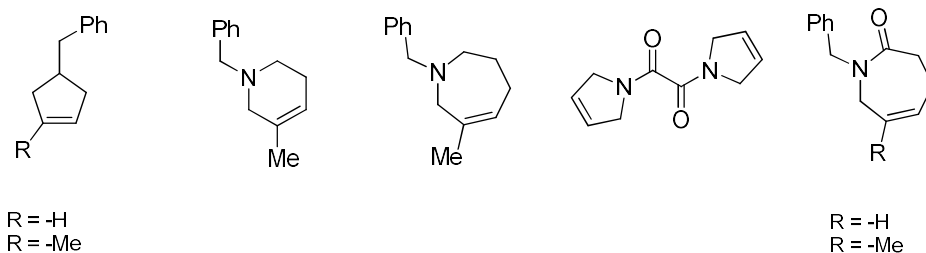


Figura 39. Derivados obtenidos por metátesis de cierre de anillo usando aminas y amidas olefínicas

3.2.1. Síntesis de quinolizinio

Nuestro grupo ha explorado la síntesis del sistema de quinolizinio a través de la reacción de metátesis de cierre de anillo. Aunque el quinolizinio podría ser obtenido mediante una ciclación implicando los enlaces β , γ y δ con respecto al nitrógeno en el azinio usado como sustrato (Figura 40), sin embargo, en la práctica, no se ha podido obtener el quinolizinio a partir del dipropenil azadieno porque ha sido imposible sintetizar este dieno bajo ninguna de las condiciones ensayadas.⁶⁰ Los resultados obtenidos mostraron que este compuesto era inestable y tendía a la isomerización del doble enlace hacia el isómero estabilizado por conjugación, desplazándose el doble enlace de la posición terminal de la cadena a la posición contigua. La formación del sistema bicíclico implicando los enlaces β y δ se consiguió usando catalizadores de Grubbs de primera y de segunda generación.

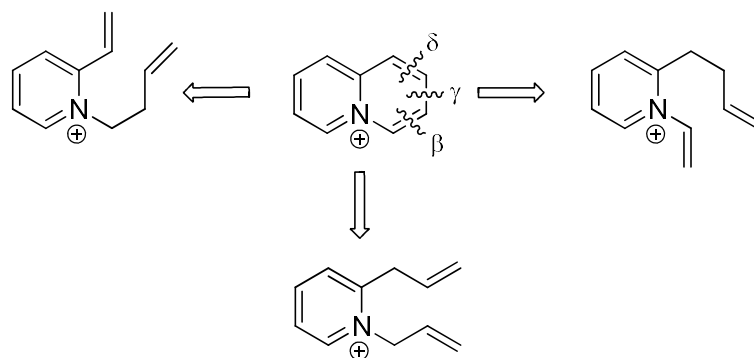
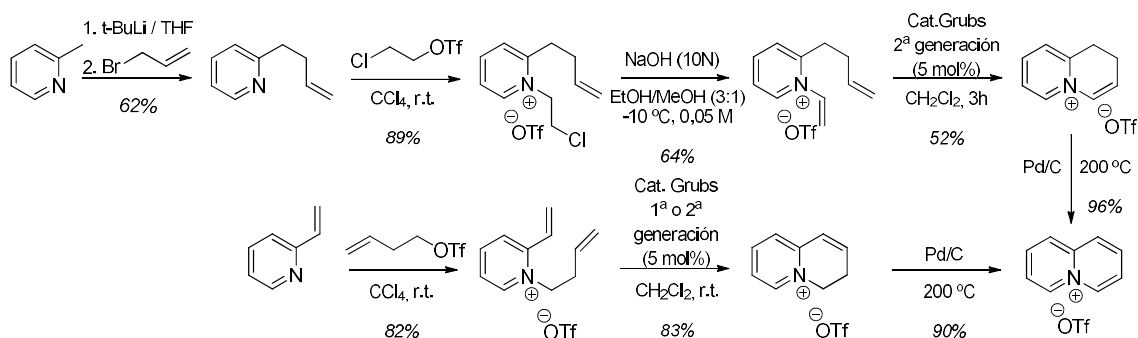


Figura 40. Desconexiones planteadas para la síntesis por metátesis del sistema de quinolizinio

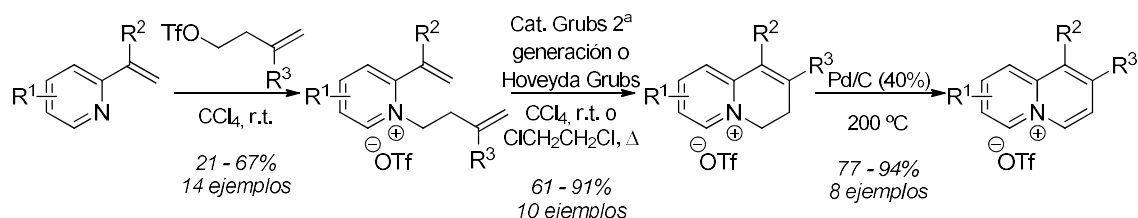
En un estudio comparativo se analizó la formación de los enlaces β y δ en la síntesis del núcleo de quinolizinio.¹⁴ Se observó que de la ruta sintética que partía desde *N*-(3-butenil)-2-vinilpiridinio para ciclar a través del enlace C1-C2, se obtuvo el triflato de quinolizinio con un

rendimiento global del 54%, mientras que la estrategia basada en la desconexión de los carbonos C3-C4, generaba el quinolizinio con solo un 18% de rendimiento global (Esquema 10). En ambos casos se hace necesaria una oxidación final de los correspondientes dihidroderivados.



Esquema 10. Estudio comparativo mediante dos rutas de la síntesis de triflato de quinolizinio

Con la aproximación basada en la desconexión entre C1-C2, se estudió la generalidad de la reacción de metátesis de cierre de anillo como método general para la obtención de derivados de quinolizinio (Esquema 11).



Esquema 11. Síntesis de derivados de quinolizinio

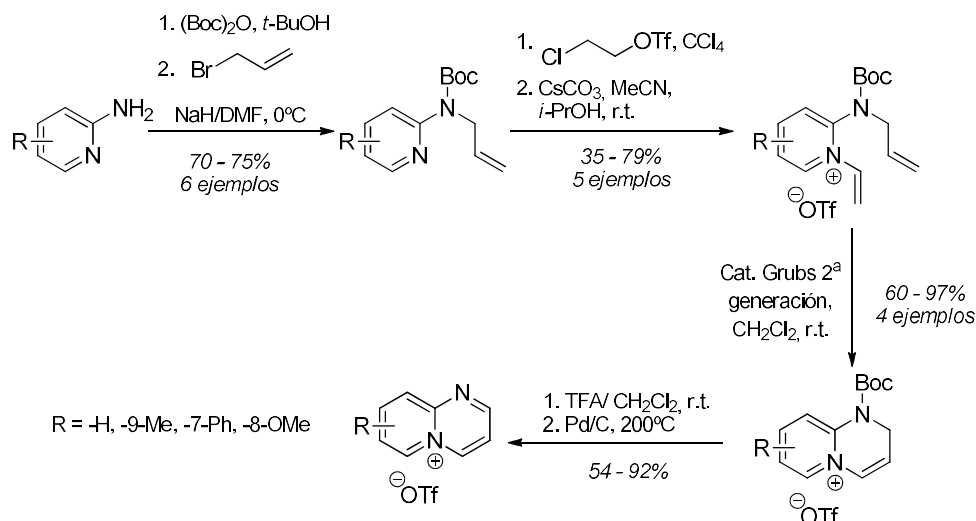
La presencia de sustituyentes en el anillo de piridina permitió la síntesis de los derivados diénicos con rendimientos moderados debido a la baja estabilidad del agente alquilante. Se observó que, cuando el sustituyente era un grupo funcional electroattractor, la reacción no se producía. Se obtuvieron derivados diénicos sustituidos en los fragmentos etenil, butenil, o en la piridina, sobre los cuales se ensayaron distintas condiciones para llevar a cabo la reacción de metátesis de cierre de anillo usando el catalizador de Grubbs de 2ª generación o Hoveyda-Grubbs para obtener los derivados de 3,4-dihidroquinolizinio correspondientes.^{57, 60} Por último,

se probaron distintas condiciones de oxidación observándose que las óptimas tenían lugar en ausencia de disolvente y con un alto porcentaje de Pd/C y calentando a 200°C. Con estas condiciones se obtuvieron los derivados de quinolizinio con buenos rendimientos.

Una vez obtenidos los sistemas de quinolizinio usando como paso clave la metátesis de cierre de anillo, se ensayó esta reacción para la obtención de azaquinolizinos. La primera síntesis de 1-azaquinolizinos fue publicada por Nesmeyanov⁶³ y colaboradores y usaba como material de partida 2-aminopiridina, la cual, bajo condiciones ácidas, era condensada con un compuesto 1,3-dicarbonílico para dar los compuestos deseados con rendimientos variables.

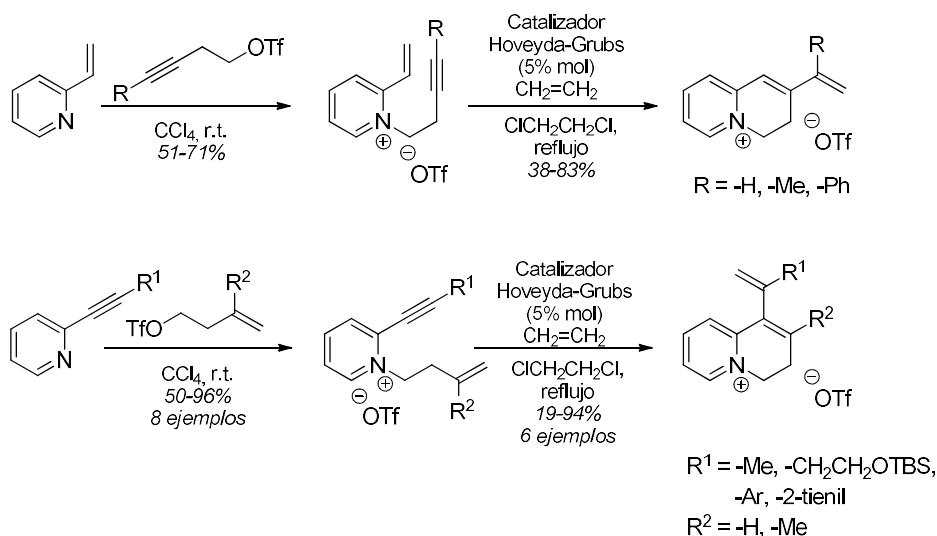
En un intento de aplicar la reacción de metátesis de cierre de anillo para la síntesis de los sistemas de 1-azaquinolizinio (pirido[1,2-*a*]pirimidinio), se comprobó que la única aproximación posible era la adaptación de la estrategia sintética basada en la desconexión entre C3-C4 para el sistema análogo de quinolizinio.

Como en el caso de la síntesis de Nesmeyanov, en esta aproximación también se parte de 2-aminopiridinas. El primer paso fue proteger la amina con Boc y luego alquilar esta posición usando bromuro de alilo en presencia de hidruro sódico. El segundo paso fue la formación del dieno, cuaternizando el nitrógeno piridínico con 2-cloroetil triflato seguido de una dehidrohalogenación para obtener el doble enlace. La reacción de metátesis de cierre de anillo en los derivados de *N*-vinil-2-propenilaminopiridinio protegidos con Boc se llevó a cabo usando el catalizador de Grubbs de 2ª generación obteniendo los derivados protegidos de 1,2-dihidroazaquinolizinio. Posteriormente se desprotegió el dihidroderivado usando ácido trifluoroacético y se oxidó el compuesto utilizando condiciones similares a las usadas para los sistemas de quinolizinio⁶³ (Esquema 12).



Esquema 12. Síntesis de derivados de azaquinolizinio

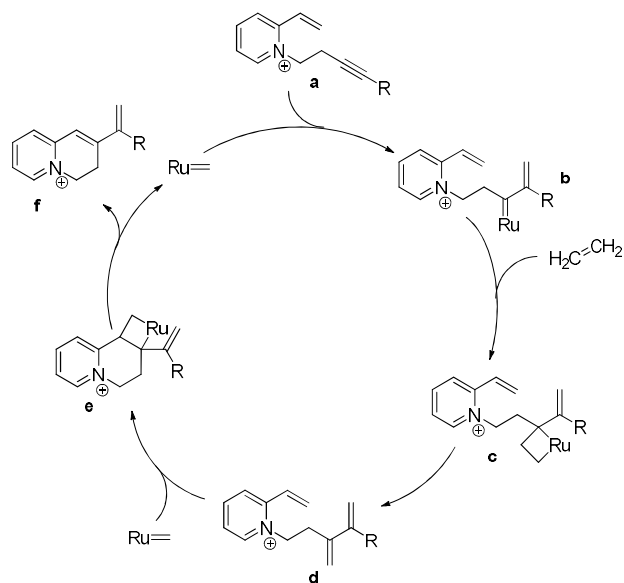
Intentando desarrollar una ruta para la obtención de derivados de benzoquinolizinio se diseñó una estrategia basada en un proceso tándem de la reacción de metátesis de cierre de anillo de eninos y una reacción de Diels-Alder. En este proceso se pretendía que el vinil dihidroquinolizinio resultante de la reacción de metátesis, fuese el dieno para una reacción de Diels-Alder en la cual se formase el derivado de benzoquinolizinio correspondiente. Aunque este proceso fue infructuoso a nivel global, sirvió para desarrollar una nueva aproximación para la obtención de 3,4-dihidroquinolizinos sustituidos en posición C1 y C2 mediante una reacción de metátesis de cierre de anillo de eninos.²¹⁰ La reacción de metátesis se llevó a cabo en este caso utilizando el catalizador de Hoveyda-Grubbs y etileno, observándose que, en ausencia de este, la reacción tendía a la polimerización. Siguiendo la misma metodología, se consiguió obtener derivados sustituidos en el vinilo de 2-vinil-3,4-dihidroquinolizinio con rendimientos variables utilizando como sustrato 1-alquil-2-vinilpiridinos (Esquema 13). Se observó que el rendimiento de la reacción dependía mucho de la sustitución, llegando a no producirse en los casos en los que el fragmento de vinilo estaba sustituido en la sal de piridinio.⁵⁸



Esquema 13. Síntesis de triflatos de 3,4-dihidroquinolizinius sustituidos con alquenos

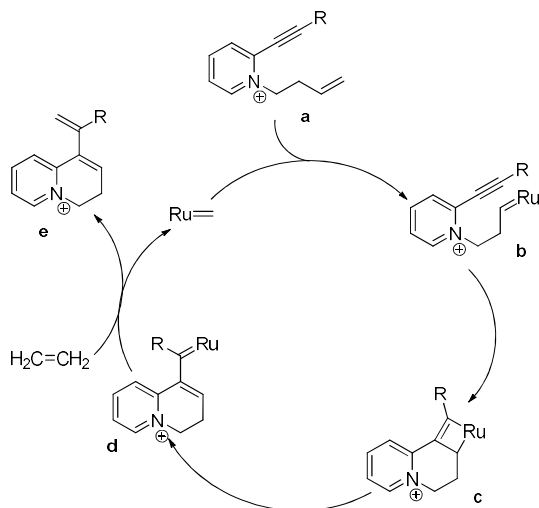
Aunque estudios mecanísticos recientes muestran que la presencia de etileno acelera la reacción por la activación inicial del doble enlace seguida del triple enlace en la enino,²¹¹ en este tipo de sustratos, el intermedio triénico (b) aislado sugiere que la activación del alquino es lo primero en ocurrir, para proseguir el ciclo catalítico y dar la metátesis de cierre de anillo obteniéndose el derivado de 3,4-dihidroquinolizinio sustituido en posición C2 (Esquema 14).

Al utilizar como sustrato derivados de sales de 1-alquenil-2-propinilpiridinio sustituidos en la cadena que contiene el doble y el triple enlace se obtuvieron las sales de 3,4-dihidroquinolizinio 1,2 disustituidas correspondientes con rendimientos variables, teniendo una especial relevancia la sustitución en el fragmento del alqueno (Esquema 15).⁵⁸



Esquema 14. Mecanismo de la metátesis de 1-alquinil-2-vinilpiridinio

Experimentos con distintos derivados de sales de 1-alquenil-2-propinilpiridinio mostraron que en ausencia de etileno la conversión es muy pobre. Estos resultados respaldan, en el caso de estos sustratos y bajo las condiciones de Mori,^{212, 213} que la metátesis se inicia en el alqueno y el etileno participa en la formación del complejo activo con rutenio.⁵⁸



Esquema 15. Mecanismo de la metátesis de 1-alquenil-2-propinilpiridinio

3.2.2. Síntesis de benzoquinolizínios

El catión benzo[*a*]quinolizinio (Figura 41) había sido sintetizado previamente siguiendo métodos clásicos de ciclación mediante la formación de los enlaces C4-N5,²¹⁴ C6-C7²¹⁵ y C1 α -C11 α ²¹⁶ a partir de piridina e isoquinolina como heterociclos de partida.

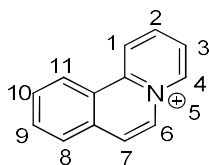
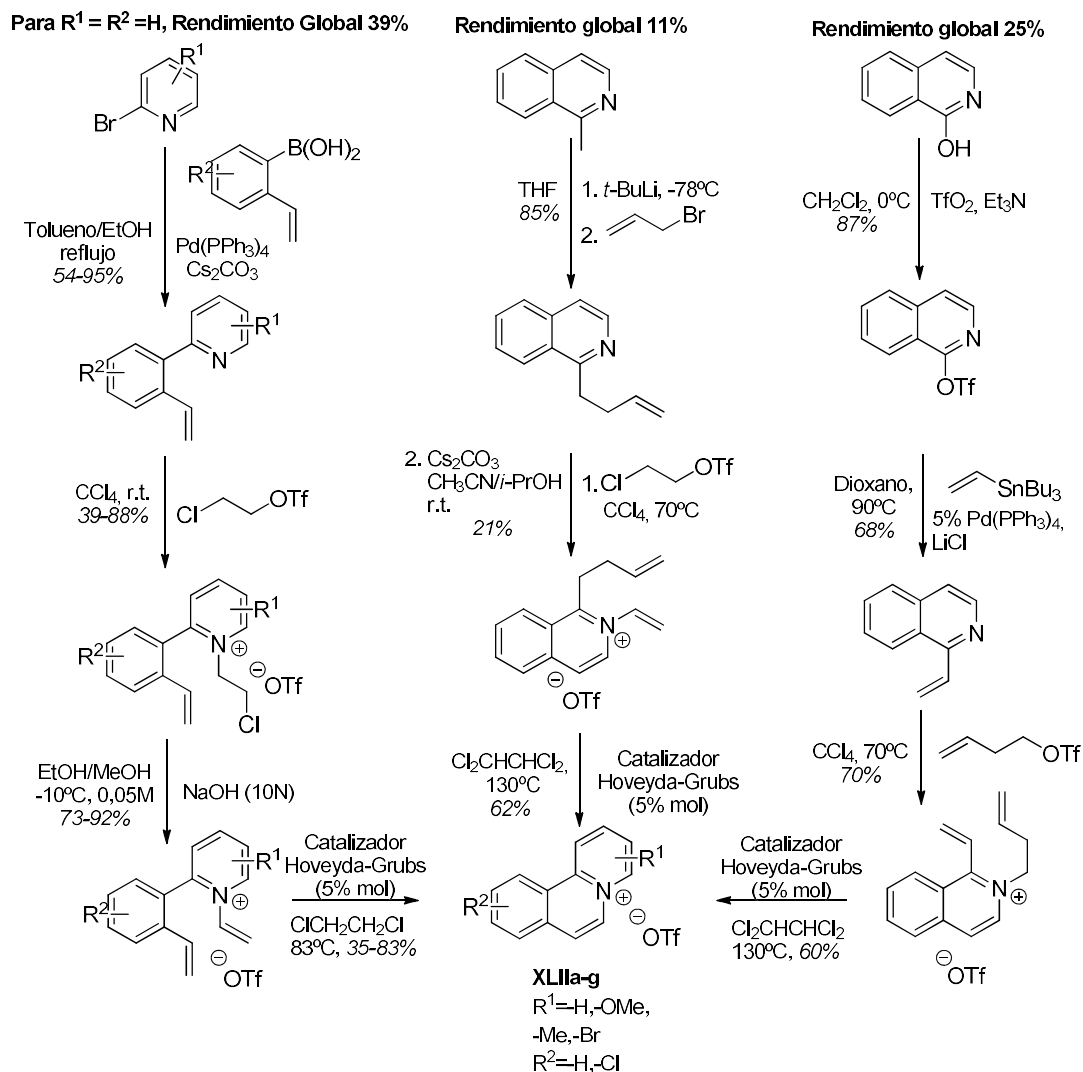


Figura 41. Estructura del sistema de benzo[*a*]quinolizinio Usando la estrategia de la metátesis de cierre de anillo, se puede optar por la desconexión entre C1-C2 y C3-C4,⁶¹ estrategias similares a las empleadas en la obtención de los sistemas de quinolizinio reseñados anteriormente. Otra aproximación que solo puede ser usada en este tipo de sistemas con 3 o más ciclos fusionados es la desconexión C6-C7, la cual también implica una metátesis con un sistema diénico altamente deficitario.⁵⁹

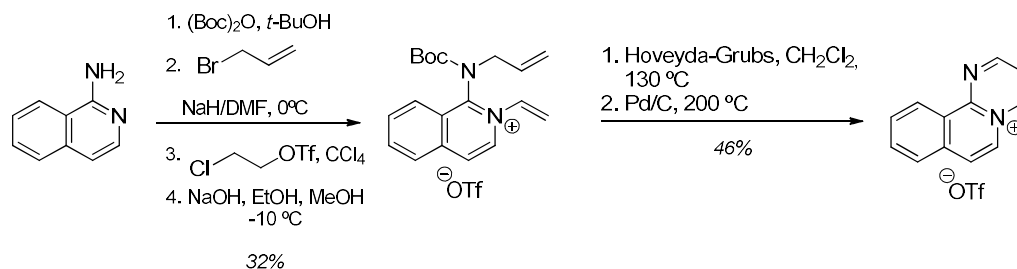
Se optimizaron las condiciones para la aproximación basada en la desconexión C6-C7 observándose que la reacción transcurría con los catalizadores de Grubbs de 1^a y 2^a generación y con el catalizador de Hoveyda-Grubbs, siendo con este el último con el que se obtenían los mejores rendimientos debido a su tolerancia a temperaturas elevadas. Se puede racionalizar que la necesidad de altas temperaturas para esta reacción se debe a que la molécula debe disponerse en una conformación plana, lo cual requiere superar la repulsión estérica de ambos sistemas aromáticos.⁵⁹

Con las condiciones optimizadas para las tres posibles estrategias se pudo observar que la desconexión C6-C7 era la que producía un mejor rendimiento global. Por tanto, se usó esta aproximación para la síntesis de los sistemas **XLIIa-g** (Esquema 16).

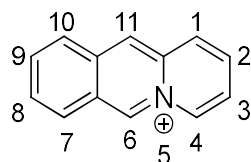


Esquema 16. Síntesis de derivados de benzo[a]quinolinizinio

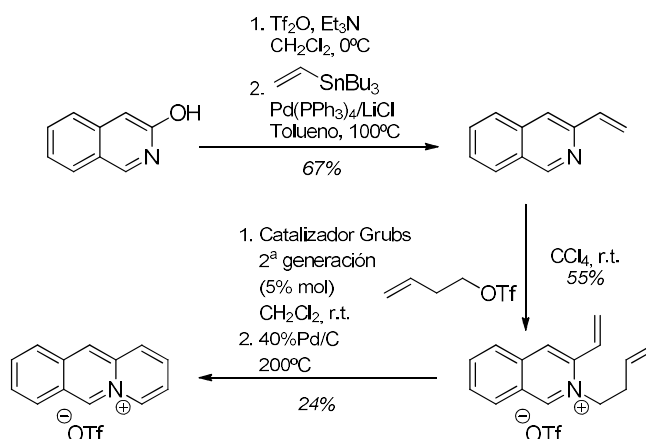
Por otro lado, utilizando la estrategia sintética explicada en el apartado anterior para la obtención de los derivados de azaquinolinizinio, se consiguió la primera síntesis del sistema pirimido[2,1-*a*]isoquinolinio (benzo-1-azaquinolinizinio) usando el catalizador de Hoveyda-Grubbs (Esquema 17).

**Esquema 17.** Síntesis de benzo-1-azaquinolizinio

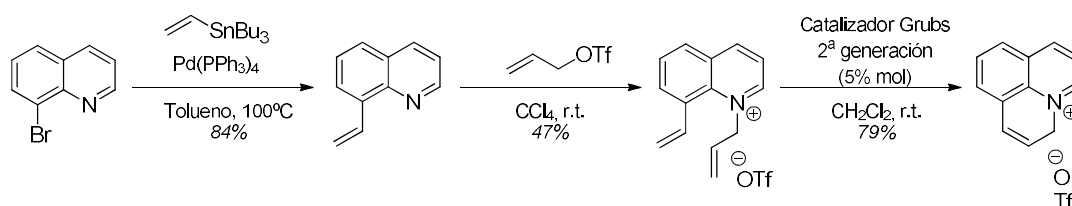
El bromuro de benzo[*b*]quinolizinio (acridizinio) fue preparado por primera vez mediante una reacción de ciclación formando el enlace C10a-C1.²¹⁷ Más adelante se mejoró el procedimiento con dos estrategias para la formación de este mismo enlace,^{218, 219} y más recientemente un nuevo método sintético condujo a la formación de estos sistemas mediante la formación del enlace N5-C6.

**Figura 38.** Estructura del sistema de benzo[*b*]quinolizinio

Mediante la reacción de metátesis de cierre de anillo, se exploraron las desconexiones C1-C2 y C3-C4. La primera de ellas condujo al producto de la reacción 3,4-dihidrobenezo[*b*]quinolizinio con un buen rendimiento, si bien la oxidación de esta sal transcurre con un rendimiento muy bajo^{57, 60} (Esquema 18). Los intentos de sintetizar un dieno susceptible de dar la reacción de metátesis de cierre de anillo formando el enlace C3-C4 no tuvieron éxito, posiblemente debido a la baja estabilidad del dieno formado en la sal de isoquinolinio.

Esquema 18. Síntesis del sistema de benzo[*b*]quinolizinio

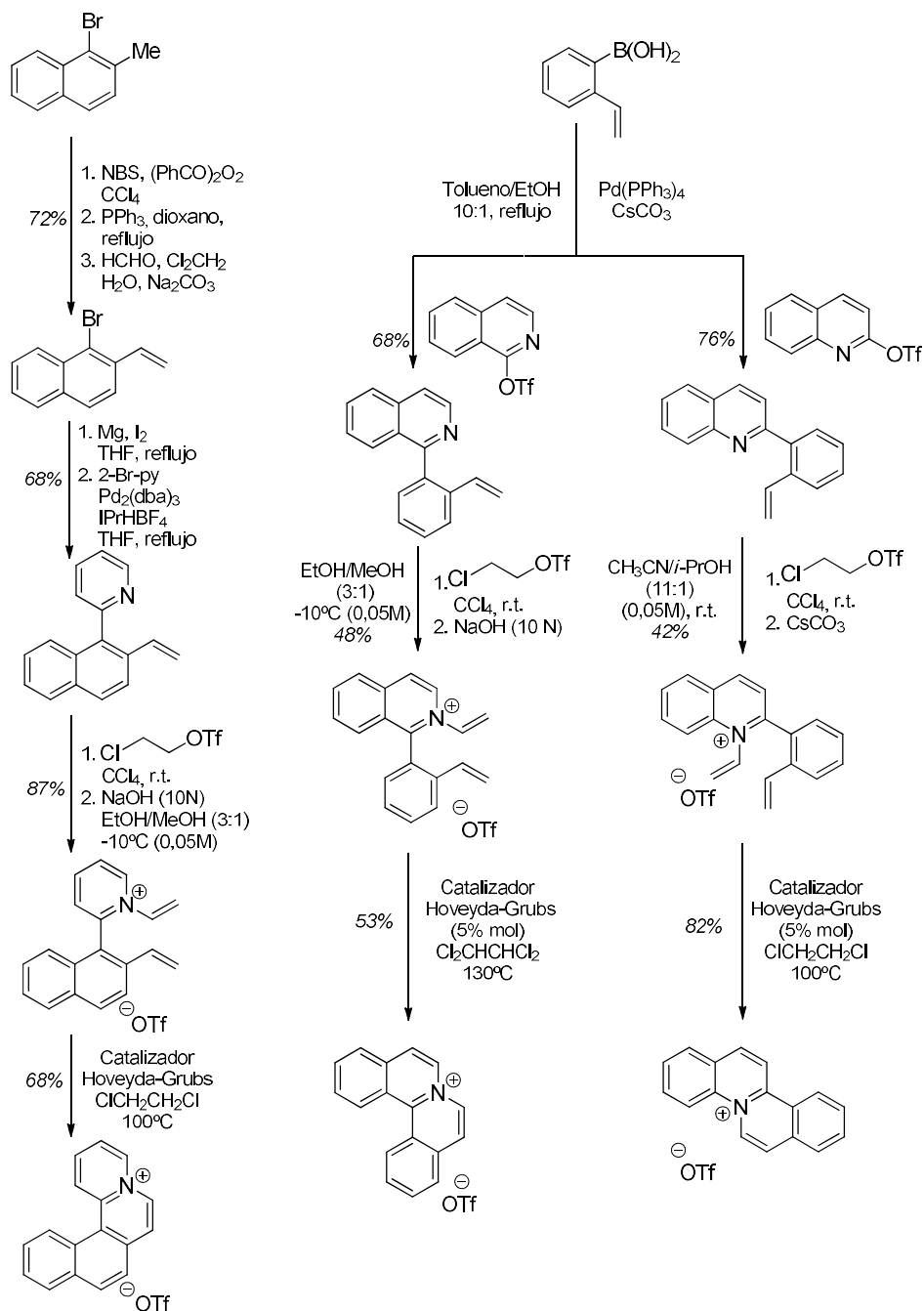
Una estrategia similar a la utilizada para la síntesis del benzo[*b*]quinolizinio se utilizó para la preparación del triflato de 3*H*-pirido[3,2,1-*ij*]quinolinio con un rendimiento global de 32%⁶⁰ (Esquema 19).

Esquema 19. Síntesis del triflato de 3*H*-pirido[3,2,1-*ij*]quinolinio

3.2.3. Síntesis de dibenzo- y naftoquinolizinios

También se ha demostrado que el procedimiento más efectivo para la síntesis de sistemas de benzo[*a*]quinolizinio puede ser fácilmente adaptado a la preparación de algunos ejemplos representativos de sistemas dibenzo- o naftoquinolizinios.

De esta manera se pudieron obtener los triflatos de dibenzo[*a,f*]quinolizinio y dibenzo[*a,h*]quinolizinio a partir de los dienos de quinolinio e isoquinolinio correspondientes. De manera análoga el sistema de nafto[1,2-*a*]quinolizinio fue sintetizado por la ruta descrita en el esquema 20.⁵⁹

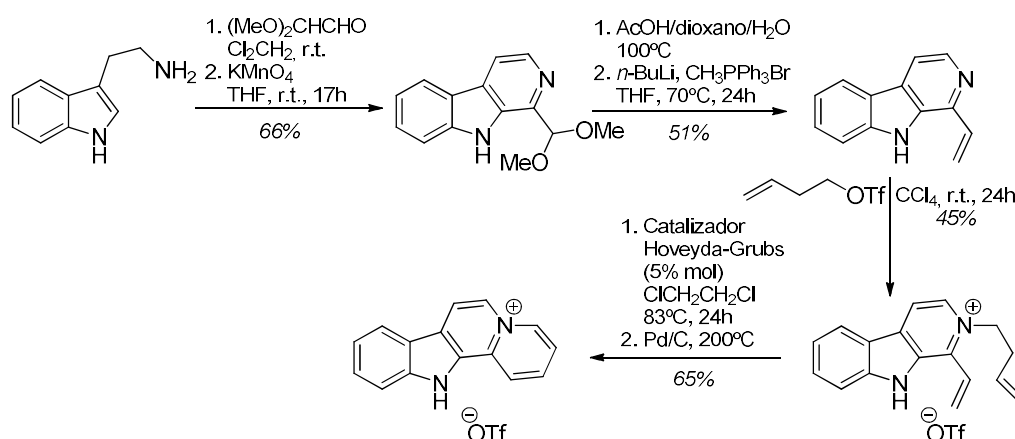
Esquema 20. Síntesis de los triflatos de dibenzo[*a,f*]quinolizinio, dibenzo [*a,h*]quinolizinio y nafto[1,2-*a*]quinolizinio

La reacción de metátesis de cierre de anillo implicando sales de azinio también se ha aplicado a la síntesis de derivados de quinolizinio no bencenoides. Un ejemplo representativo ha sido el sistema de indolo[2,3-*a*]quinolizinio, un núcleo tetracíclico presente en diversos alcaloides naturales que presentan actividad biológica.

Nuestro grupo ha descrito dos estrategias sintéticas para la obtención de este catión cuyo paso clave es la metátesis de cierre de anillo. Se plantearon dos aproximaciones para la síntesis total de este núcleo: la desconexión de los enlaces C1-C2 y C3-C4.⁶²

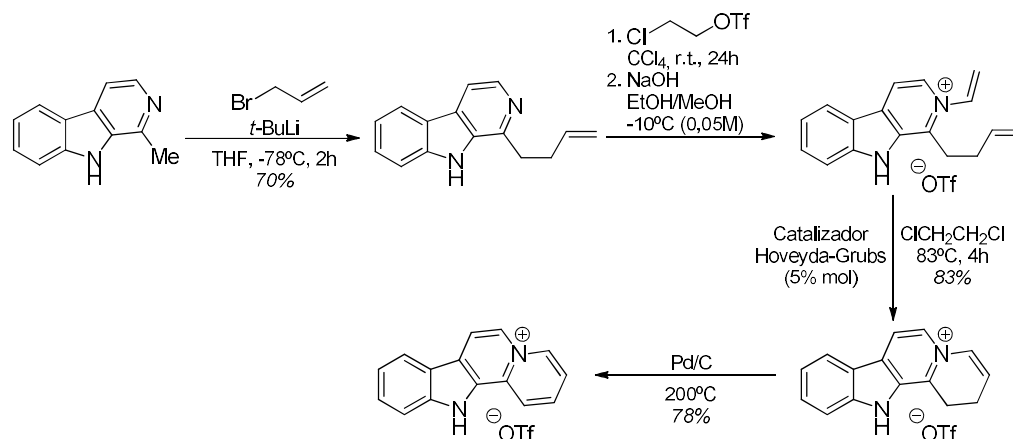
En ambos casos se realizó una optimización en las condiciones de reacción del paso clave, la metátesis de cierre de anillo, observándose que los mejores resultados se obtenían en dicloroetano a 83°C usando el catalizador de Hoveyda-Grubbs.

En la ruta basada en la desconexión C1-C2, usando triptamina como producto de partida, se obtuvo el indolo[2,3-*a*]quinolizinio en 7 pasos con rendimiento global del 5% (Esquema 21).



Esquema 21. Síntesis del triflato de indolo[2,3-*a*]quinolizinio mediante la desconexión C1-C2

En la ruta basada en la desconexión C3-C4 se usa como sustrato de partida en núcleo de harmano comercial y en solo 5 pasos se obtiene el compuesto deseado con un rendimiento global del 36% (Esquema 22).



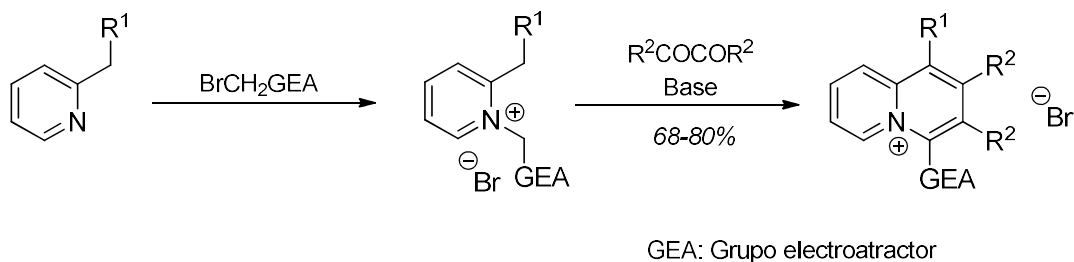
Esquema 22. Síntesis del triflato de indolo[2,3-*a*]quinolizinio mediante la desconexión C3-C4

En líneas generales, se observa que la estrategia basada en la metátesis de cierre de anillo es una estrategia sintética general para la síntesis de diversos sistemas tipo azonia, con buenos rendimientos, a partir de sustratos cargados. En la mayoría de los casos fue necesario aplicar una oxidación final para obtener el heterociclo deseado.

3.3. Condensación de Westphal

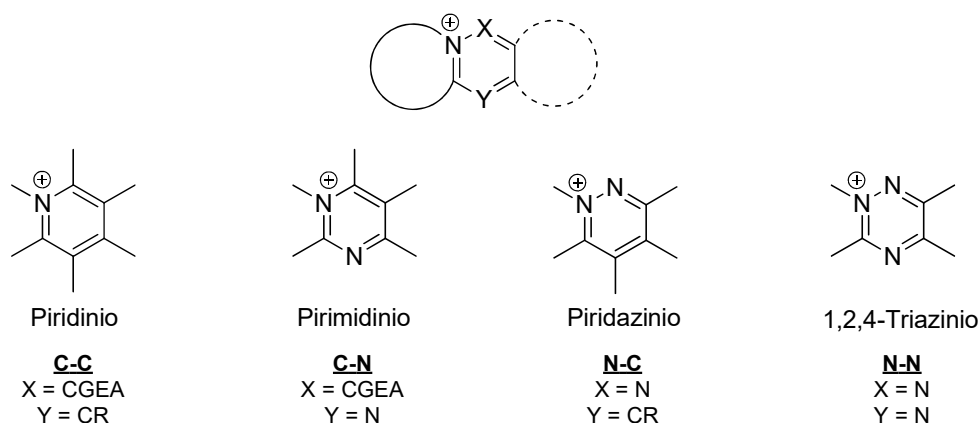
Esta reacción de condensación [4+2], que fue desarrollada por Westphal y colaboradores en 1961,³⁶ también ha sido ampliamente usada y estudiada en nuestro grupo para la obtención de una gran variedad de sales de quinolizinio con distinta sustitución y de otros sistemas catiónicos análogos.

Los primeros sustratos empleados en esta reacción fueron una sal de piridinio con dos metilenos activados en las posiciones N1 y C2 y un compuesto 1,2 dicarbonílico. Ambos, en presencia de una base, normalmente una amina secundaria o terciaria o bicarbonato sódico, producen una doble condensación formando un nuevo ciclo de seis miembros fusionado al de partida.⁵⁰ Así, se consiguió la síntesis de diversas sales de quinolizinio sustituidas³⁶ mediante esta reacción, usando como reactivos de partida sales sustituidas en el resto alquílico de *N*-alquil-2-picolinio (1,2-dinucleófilo) y 1,2 dicetonas (1,2-dielectrófilo). La reacción transcurrió con éxito con diferentes alquil y aril dicetonas y quinonas y sales de piridinio que tuviesen un grupo electroatractor unido al metileno contiguo a N1 para facilitar la formación del iluro (Esquema 23).

**Esquema 23.** Condensación de Westphal

En años posteriores, este tipo de condensación se fue extendiendo a distintas sales de azinio y azolio en las cuales se han usado sistemas con distintos sustituyentes en N1 y C2.

Este tipo de condensación se puede clasificar en función de las posibles combinaciones de los sustituyentes en N1 y C2 de la sal de cicloimonio, lo cual corresponde a la formación de distintos anillos hexagonales. En principio, hay cuatro posibilidades de condensación (C-C, C-N, N-C, N-N) sin embargo, en la bibliografía solo se han recogido ejemplos de condensación de los tipos C-C, N-C y N-N pero no del tipo C-N (Figura 42).

**Figura 42.** Sistemas catiónicos formados por condensación de Westphal

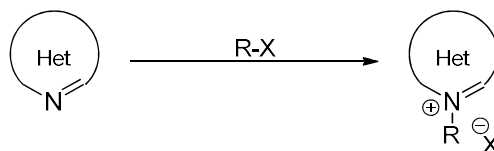
Las condensaciones del tipo C-C y N-C se producen en medio básico y las del tipo N-N lo hacen tanto en medio básico como en medio ácido. Dentro de cada tipo de condensación las condiciones experimentales empleadas son variadas.

A continuación, se describirá la preparación de las sales de azinio y azolio, sustratos de esta reacción, y después se comentará la reacción de condensación, clasificándola según las distintas posibilidades de condensación

3.3.1. Síntesis de sales de azinio y azolio

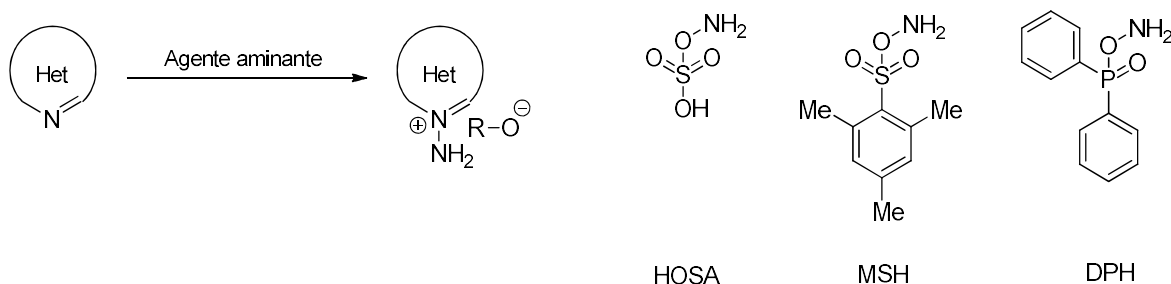
En este conjunto de sales se agrupan todos aquellos compuestos con una estructura cíclica que poseen un átomo de nitrógeno cuaternizado.²²⁰

La alquilación del nitrógeno de la azina o azol se realiza mediante la denominada reacción de Menshutkin,²²¹ proceso que supone la cuaternización del heterociclo con un haluro de alquilo (Esquema 24).



Esquema 24. Reacción de Menshutkin

La obtención de sales de *N*-aminocicloimonio está descrita, en la mayoría de los casos, por aminación directa del heterociclo empleando diversos reactivos entre los que destacan el ácido *O*-hidroxilaminosulfónico (HOSA),²²² el *O*-hidroxilaminomesitilensulfonato (MSH)²²³ y el *O*-(difenilfosfinoil)hidroxilamina (DPH)²²⁴ (Esquema 25).



Esquema 25. Aminación del nitrógeno heterocíclico y agentes aminantes

El MSH es el reactivo más usado en las aminaciones de heterociclos debido a:

- Sencillez del procedimiento experimental en las reacciones de aminación con un fácil aislamiento del producto de reacción.

- Se pueden usar disolventes orgánicos habituales.
- Las condiciones de reacción son suaves ya que es un agente aminante muy reactivo.
- Se obtienen rendimientos superiores en la mayoría de los casos en comparación con otros agentes aminantes.

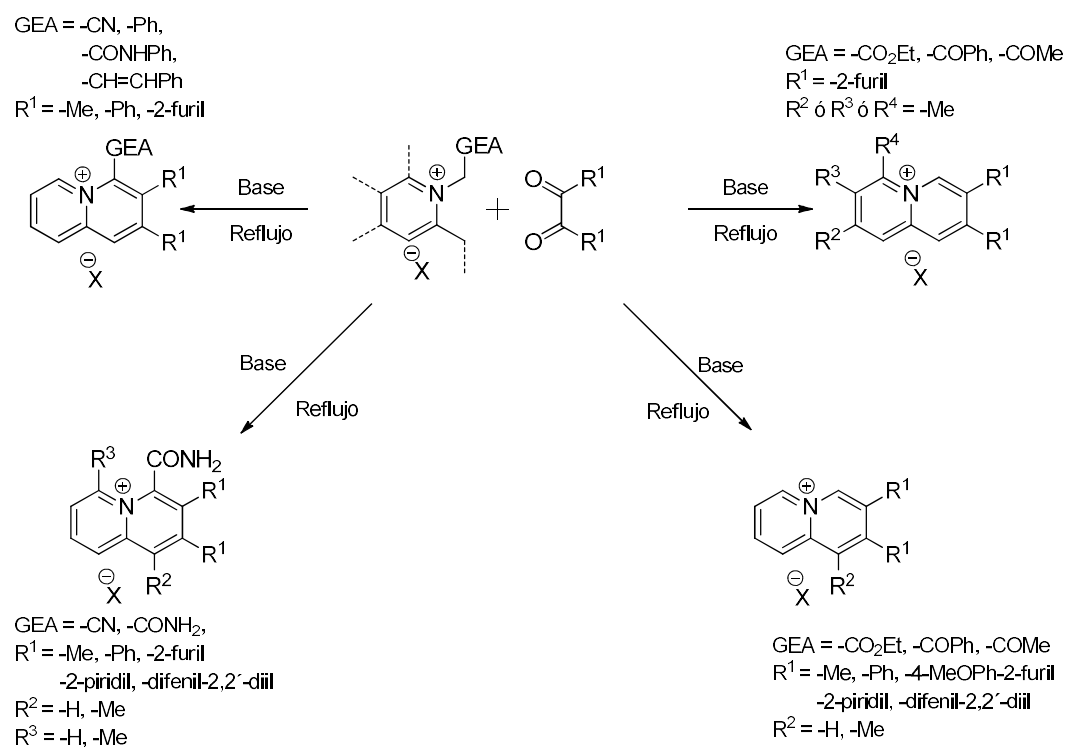
Como inconveniente cabe resaltar que es inestable, lo que dificulta su conservación, aunque puede mantenerse inalterado varios meses si se conserva a 0°C.

3.3.2. Tipos de condensaciones de Westphal en función del sustrato

3.3.2.1. Condensación tipo C-C

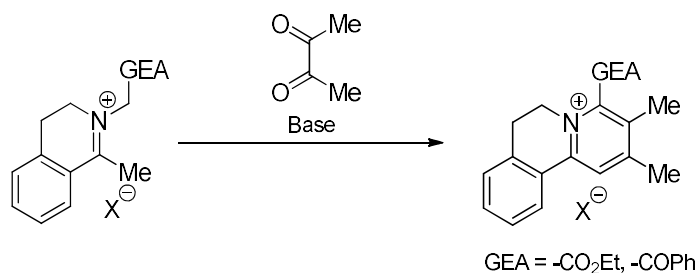
3.3.2.1.1. Condensación C-C con sales de azinio

En el trabajo seminal de Westphal,³⁶ se describe un amplio número de ejemplos de condensación de sales derivadas de 2-picolina que presentan un grupo electroattractor con distintos 1,2 dicarbonilos simétricos (Esquema 26).



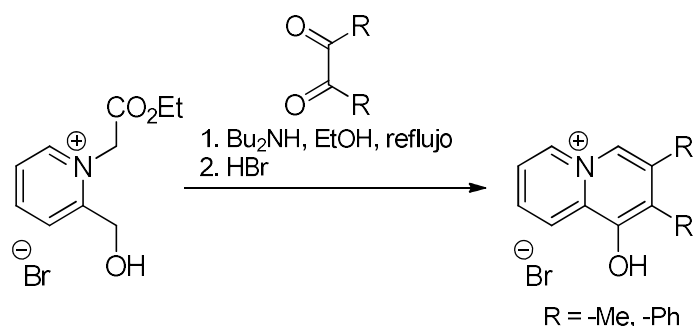
Esquema 26. Ejemplos de Condensaciones publicados por Westphal en sus primeros trabajos

Otros ejemplos interesantes que se detallan son las condensaciones con sales de azinio parcialmente aromáticas. (Esquema 27).



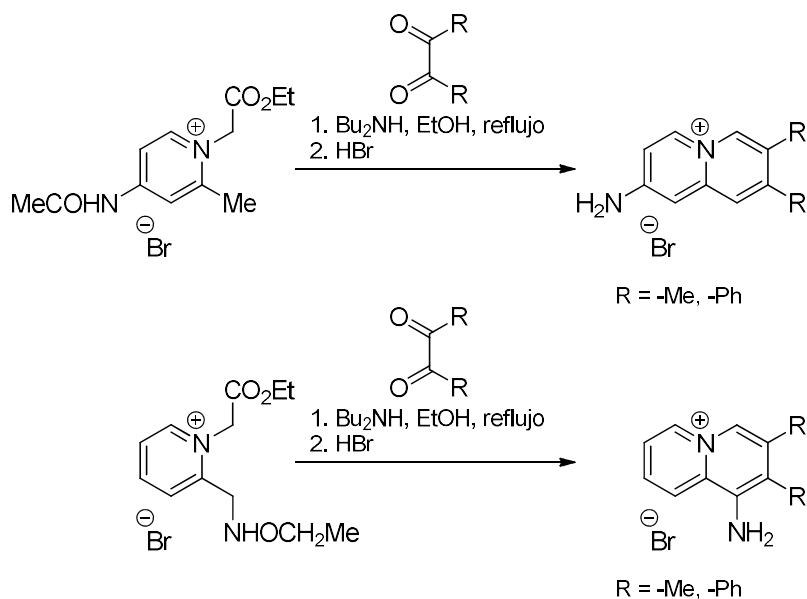
Esquema 27. Condensación de Westphal con sustrato parcialmente insaturados

Kröhnke y colaboradores,²²⁵ en un estudio del año 1964 dirigido a la síntesis de derivados de sales de 1-hidroxiquinolinio, describieron la formación de este tipo de derivados mediante la condensación de Westphal utilizando como sustrato de partida bromuro de 1-etoxycarbonilmetil-2-hidroxiacetilpiridinio y butano-2,3-diona o difeniletanodiona. De esta manera, se obtuvieron los correspondientes productos de condensación con un rendimiento del 5% o de 60% respectivamente (Esquema 28).



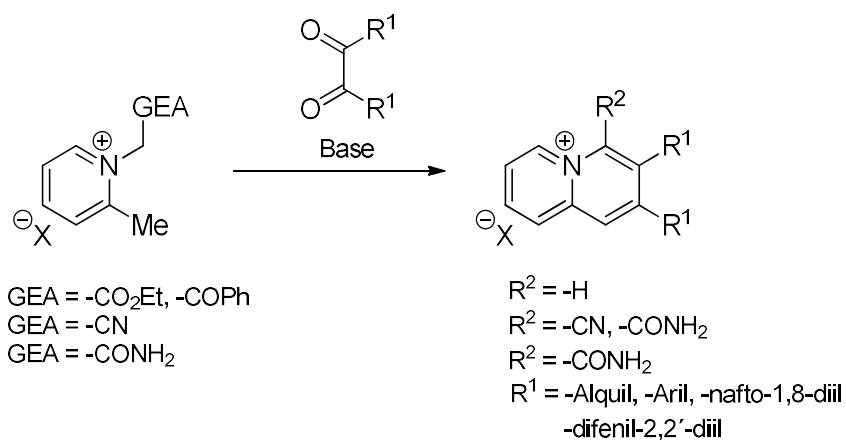
Esquema 28. Síntesis de sales de hidroxiquinolinio

En 1968 Jones y colaboradores,²²⁶ describieron la síntesis de sales de 1-amino y 2-aminoquinolinio a partir de las correspondientes sales de azinio. Para que el grupo amino no interfiriese en la condensación fue protegido en forma de amida con un grupo acetilo. La reacción transcurre en etanol usando dibutilamina como base (Esquema 29).



Esquema 29. Síntesis de 1 y 2-aminoquinolizinio

En 1985, nuestro grupo de investigación describió el empleo de distintas sales de 2-metilpiridinio con diferentes grupos electroattractores como sustratos C-C²²⁷ (Esquema 30).



Esquema 30. Condensación de Westphal utilizando sales de metilpiridinio como sustrato

En una publicación posterior²²⁸ ese mismo año se describió una amplia variedad de ejemplos de condensación de Westphal completando las realizadas hasta el momento de tipo C-C a

partir de sales de azinio, como sales de piridinio, 5,6,7,8-tetrahidroquinolinio, 1-metilisoquinolinio y 1-metil-3,4-dihidroisoquinolinio (Figura 43).

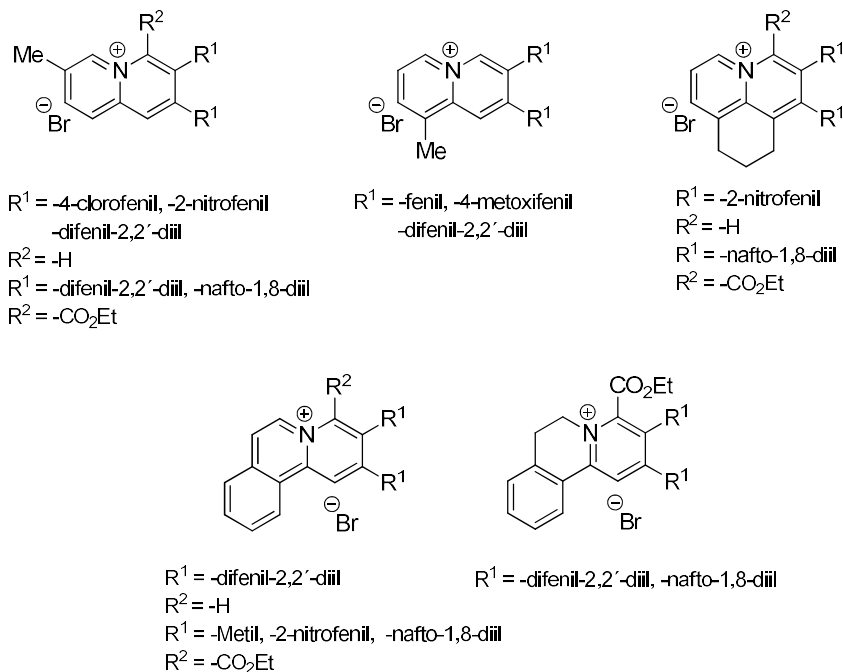
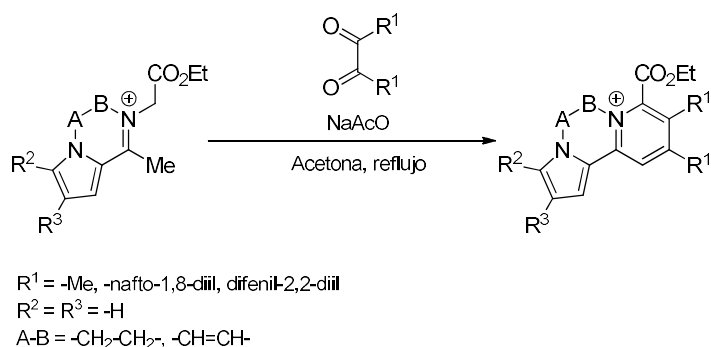


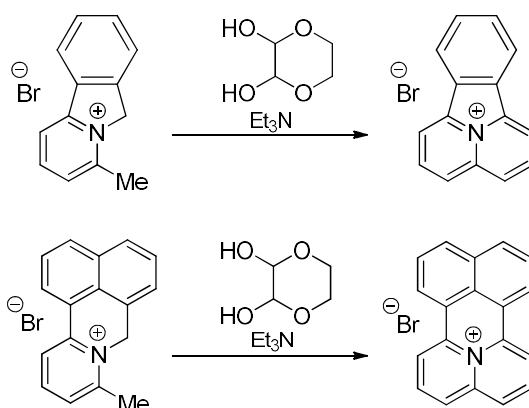
Figura 43. Ejemplos de productos de la condensación de Westphal usando como sustrato sales de azinio

En 1991, nuestro grupo de investigación publicó un artículo en donde se refiere a la síntesis de diversos sistemas heterocíclicos planos derivados de pirido[1,2-*a*]pirrolo[2,1-*c*]pirazinio,⁴¹ con la peculiaridad de tener un fragmento π donador y otro π aceptor unidos covalentemente, lo cual permite la transferencia de densidad electrónica por deslocalización de la carga positiva de entre los dos nitrógenos (Esquema 31).



Esquema 31. Síntesis de heterociclos con un fragmento π -donador y otro π -aceptor

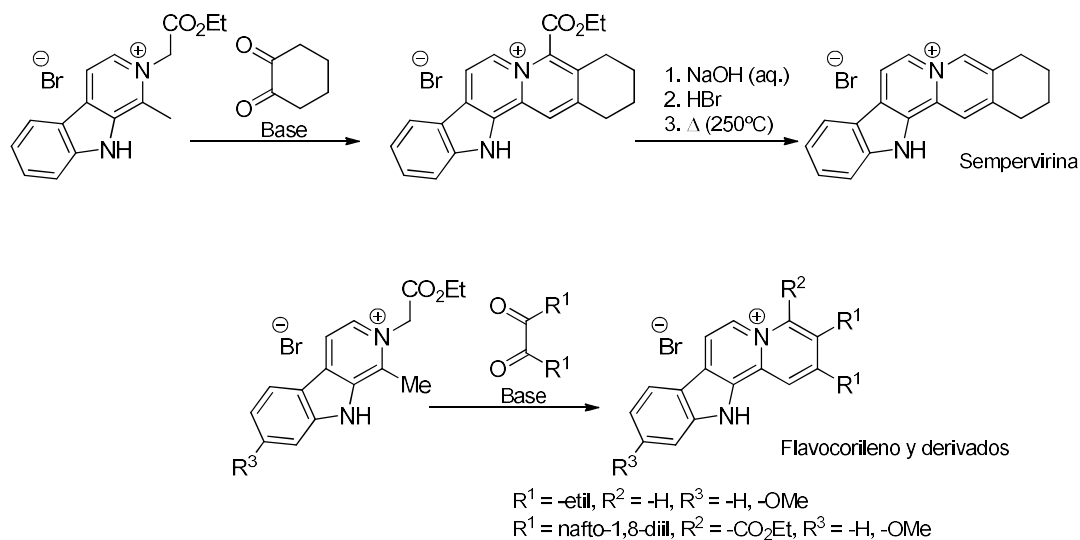
Una de las limitaciones en los primeros ejemplos de esta reacción de condensación era la necesidad de que el nuevo ciclo formado contase con los sustituyentes correspondientes al fragmento 1,2 dicarbonílico, ya que obtener el derivado sin sustituir pasaba por usar glioxal como dicarbonilo. Este hándicap se solventó mediante el uso del 1,4-dioxano-2,3-diol (DODO) como equivalente sintético del glioxal, obteniendo de esta manera sistemas de quinolizinio no sustituidos, lo que permitía el acceso a compuestos catiónicos policíclicos no sustituidos (Esquema 32).^{229, 230, 46}



Esquema 32. Condensación de Westphal usando 1,4-dioxano-2,3-diol (DODO)

Uno de los ejemplos más interesantes de la aplicación de la condensación de Westphal ha sido la síntesis del alcaloide de tipo indólico Sempervirina.²³¹ Este alcaloide se obtuvo por condensación del bromuro de 1-metil-2-etoxycarbonylmethyl-9H-pirido[3,4-b]indolinio con 1,2 ciclohexanona en medio básico seguido de la posterior hidrólisis básica del ester resultante y

por último una descarboxilación térmica del ácido carboxílico formado a 250°C. Usando también esta sal de cicloimonio derivada de β -carbolina se consiguió la síntesis de otros alcaloides de tipo indólico de con interés biológico⁴⁰ entre los que se encuentra el flavocorileno,²³² además de otros derivados resultantes de la condensación con diversas 1,2-dicetonas (Esquema 33).

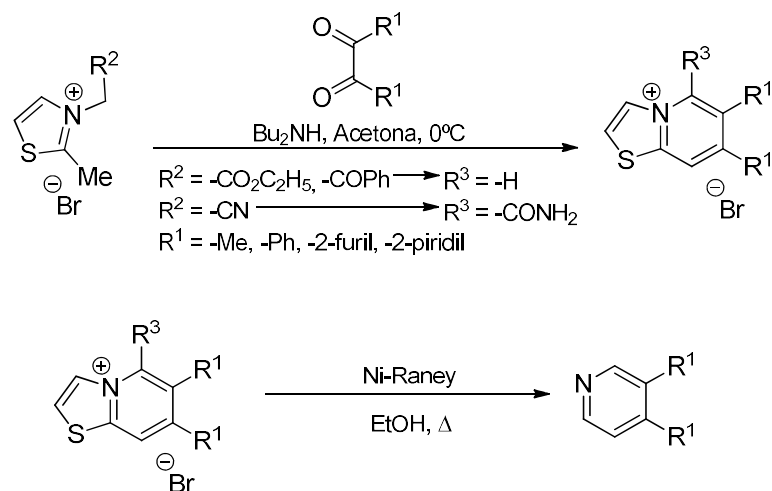


Esquema 33. Síntesis de sempervirina y análogos de flavocorileno

3.3.2.1.2. Condensación C-C con sales de azolio

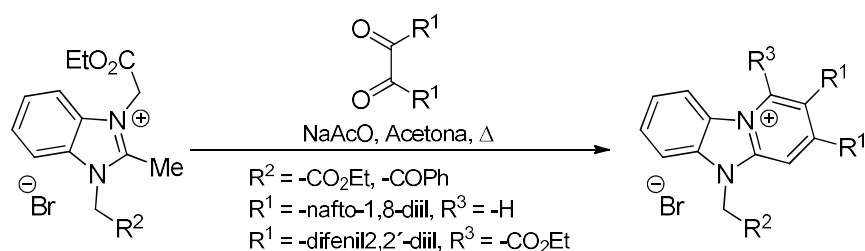
Westphal en su trabajo publicado en 1969⁷⁰ describió por primera vez sustratos pentagonales, en este caso sales de azolio de tipo C-C. A partir de las sales de 2-metiltiazolio se obtienen sales de tiazolo[3,2]piridinio.

Cuando estas sales son tratadas con Ni-Raney en EtOH se produce una degradación del anillo de tiazol⁷⁰ permitiendo obtener piridinas sustituidas en posición 3 y 4 (Esquema 34).



Esquema 34. Condensación de Westphal usando como sustrato sales de tiazolio

En 1986 nuestro grupo de investigación generalizó el estudio de la condensación con derivados de tiazol²³³ completando el realizado inicialmente por Westphal. Además, en 1996 también describió condensaciones de tipo C-C con sales de benzimidazolio^{44, 174} (Esquema 35).

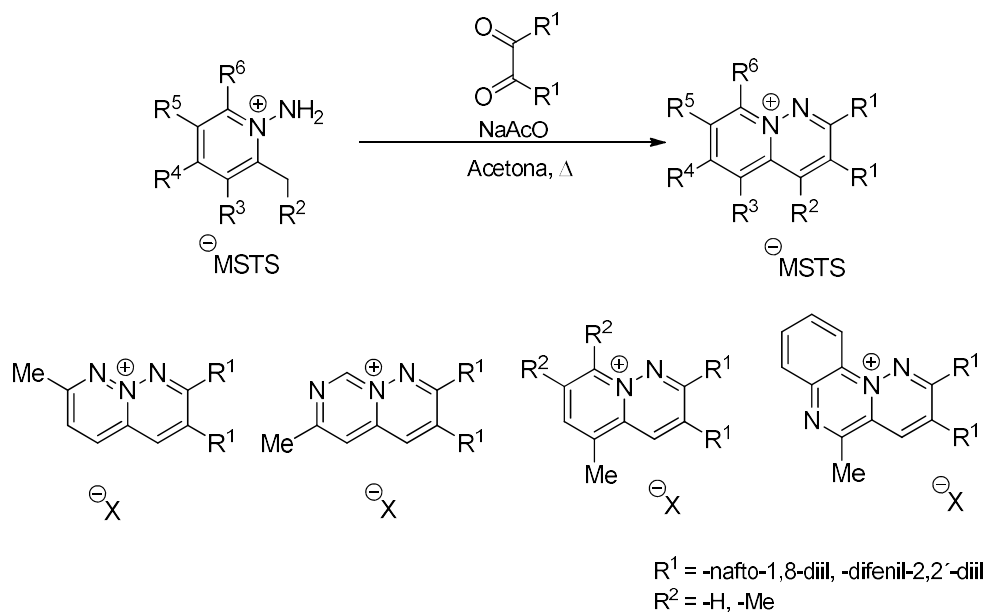


Esquema 35. Condensación de Westphal usando como sustrato sales de benzimidazolio

3.3.2.2. Condensación tipo N-C

3.3.2.2.1. Condensación N-C con sales de azinio

En 1990 se publicó el primer trabajo³⁸ sobre condensación con sustratos azinio del tipo N-C donde se recogen derivados de azaquinolizinio como resultado de la condensación de acenaftoquinona o fenantroquinona con sales de N-aminoazinio derivadas de 2-metilpiridina, 1-metilisoquinolinas y 2-metilquinolinas (Esquema 36). Posteriormente el trabajo se amplió con sales de cicloimonio con 2 nitrógenos en el anillo heterocíclico.⁴²



Esquema 36. Condensación de Westphal usando un sustrato aminoazinio

Se ha aplicado la condensación de tipo N-C a la obtención de algunos derivados de piridazinio con interés como intercalantes de ADN^{41, 43, 173} (Figura 44).

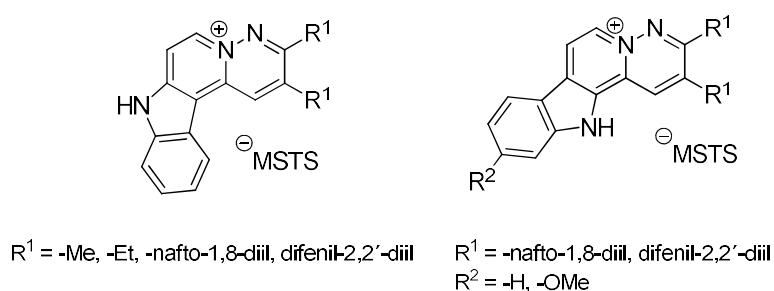


Figura 44. Derivados de piridazinio con interés como intercalantes de ADN

3.3.2.2.2. Condensación N-C con sales de azolio

Con los primeros ejemplos de condensación con sustratos *N*-aminoazinio⁴² aparecieron también los ejemplos con los sustratos de azolio tipo N-C. En este trabajo se recogen ejemplos de derivados de tiazol, benzotiazol, benzimidazol y benzoselenazol (Figura 45).

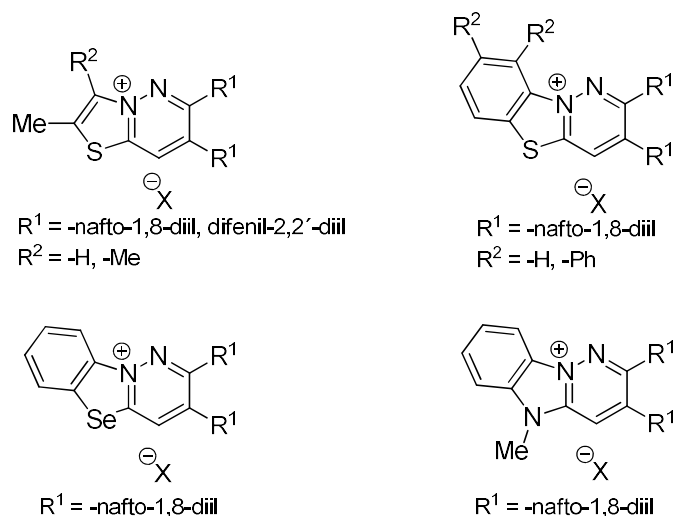
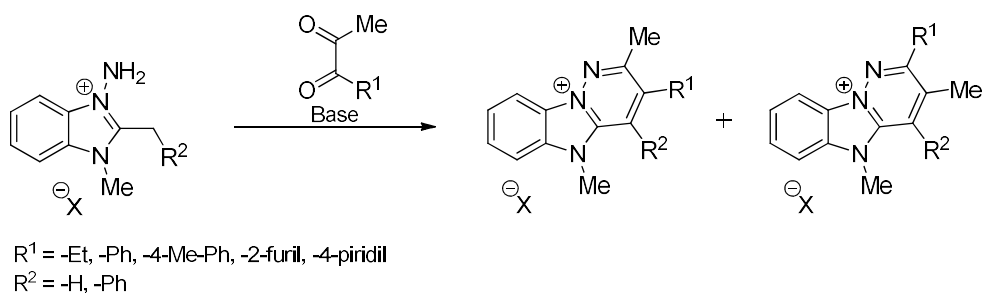


Figura 45. Productos obtenidos mediante condensación de Westphal de tipo N-C con sustratos azolio

Los sistemas de *N*-aminobenzimidazolio han sido utilizados para el estudio de la condensación de Westphal asimétrica⁴³ donde la relación entre regioisómeros varía en función de los sustituyentes (Esquema 37).



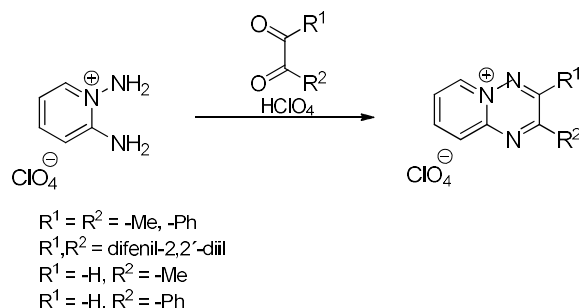
Esquema 37. Estudio de la condensación de Westphal asimétrica

3.3.2.3. Condensación tipo N-N

3.3.2.3.1. Condensación N-N con sales de azinio

Kost y colaboradores²³⁴ a principios de los 70 observaron que las sales de 1,2-diaminopiridinio reaccionan con 1,2-dicarbonilos en medio ácido. Cuando con estos sustratos se usan derivados

de RCOCHO como compuestos dicarbonílicos asimétricos se produce una total regioselectividad en la reacción (Esquema 38).

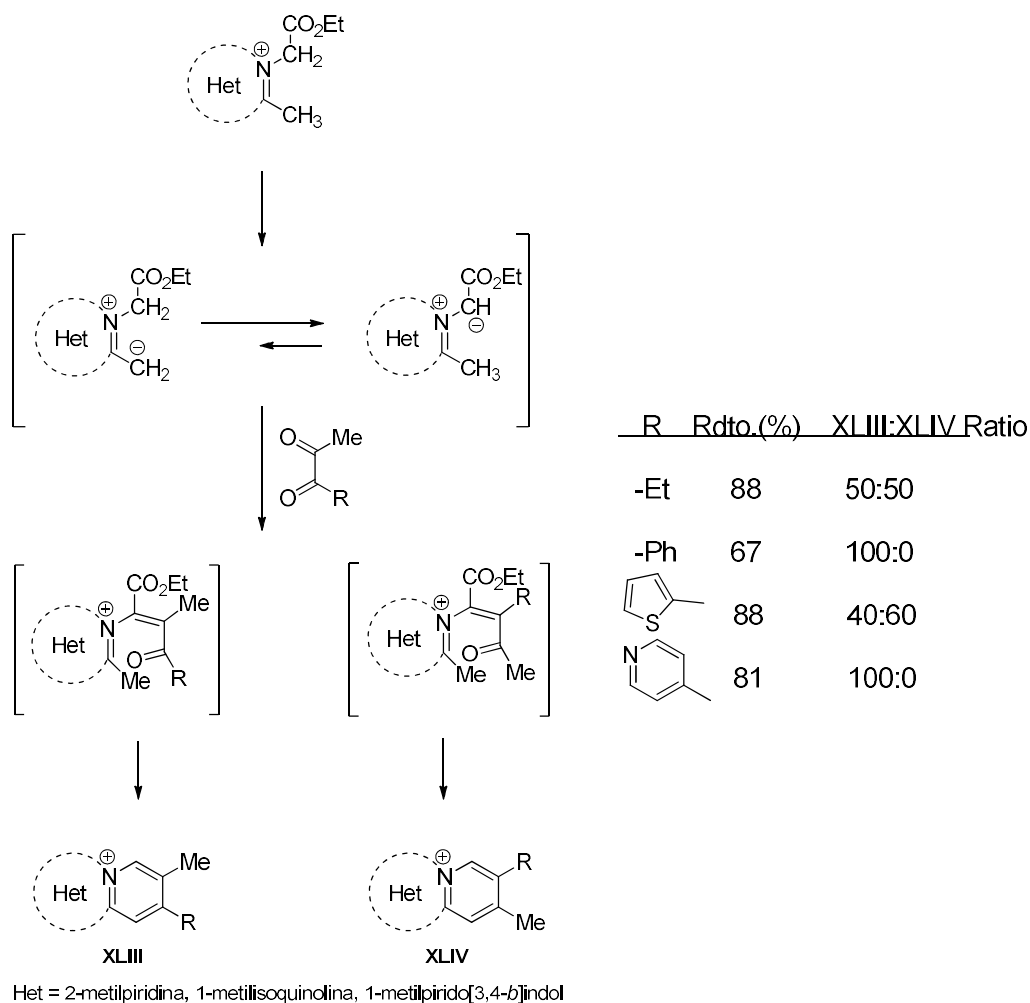


Esquema 38. Condensación de Westphal con sustratos N-N

3.3.3. Regioselectividad en la condensación de Westphal

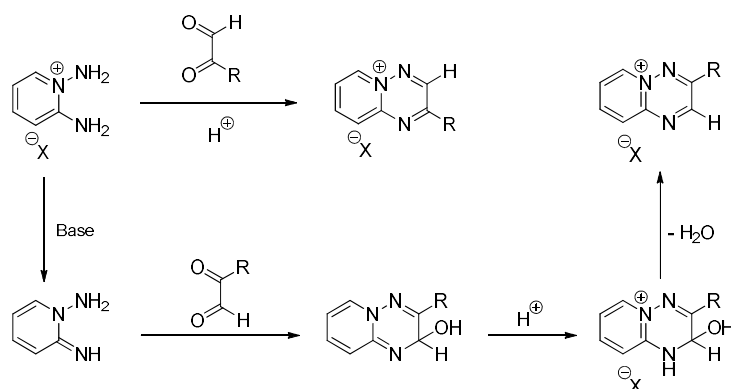
La regioselectividad en la condensación de Westphal ha sido investigada por nuestro grupo para sustratos C-C y sustratos N-C con diferentes compuestos dicarbonílicos asimétricos (1-aril-2-propanodionas) en medio básico. La deprotonación inicial de la sal de cicloimonio de partida produce el *N*-iluro intermedio más estable. La reacción de este iluro con la dicetona produce el intermedio (**XLIII**) bajo condiciones de control cinético, mientras que el intermedio más conjugado (**XLIV**) es el producto de control termodinámico. El ratio molar (**XLIII**)/(**XLIV**) depende en gran medida de las características electrónicas del grupo arilo (fenil o heteroaril) en el compuesto 1,2-dicarbonílico.

En los resultados obtenidos se observa que para los compuestos dicarbonílicos con 1(4-piridil) y 1-fenil-1,2-propanodionas se producen los derivados con metilo en posición 2 únicamente. Por otra parte, para sistemas aromáticos π excedentes como 1-(2-tienil)-1,2-propanodionas se obtuvo cantidades significativas del isómero (**XLIV**) como consecuencia de la mayor estabilidad del intermedio más conjugado. Cuando se usó 2,3-pentanodiona como ejemplo de dicarbonilo sin efectos electrónicos se obtuvo una mezcla 1:1 entre los dos regioisómeros posibles (Esquema 39).



Esquema 39. Condensación de Westphal con dicetonas asimétricas

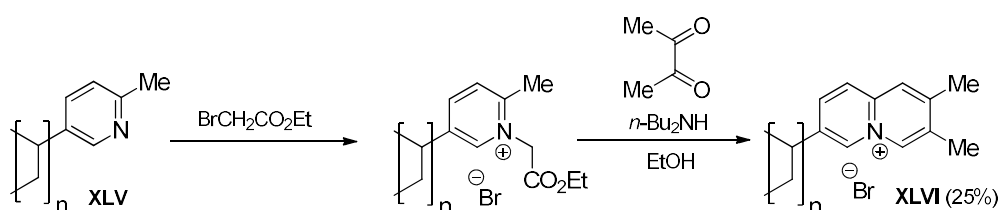
En dos trabajos de Hajós²³⁵ y colaboradores se profundiza en las condensaciones del tipo N-N para compuestos dicarbonílicos asimétricos, donde se encontró que, dependiendo de las condiciones experimentales, bien ácidas o básicas, se consigue un control total de la regioselectividad en la condensación de sustratos N-N con 1,2-dicarbonilos alquil o arilgloxal. La regioselectividad demostrada se debe a la distribución de cargas en los sustratos de partida (Esquema 40).



Esquema 40. Condensaciones tipo N-N

3.3.4. Condensación de Westphal en fase sólida

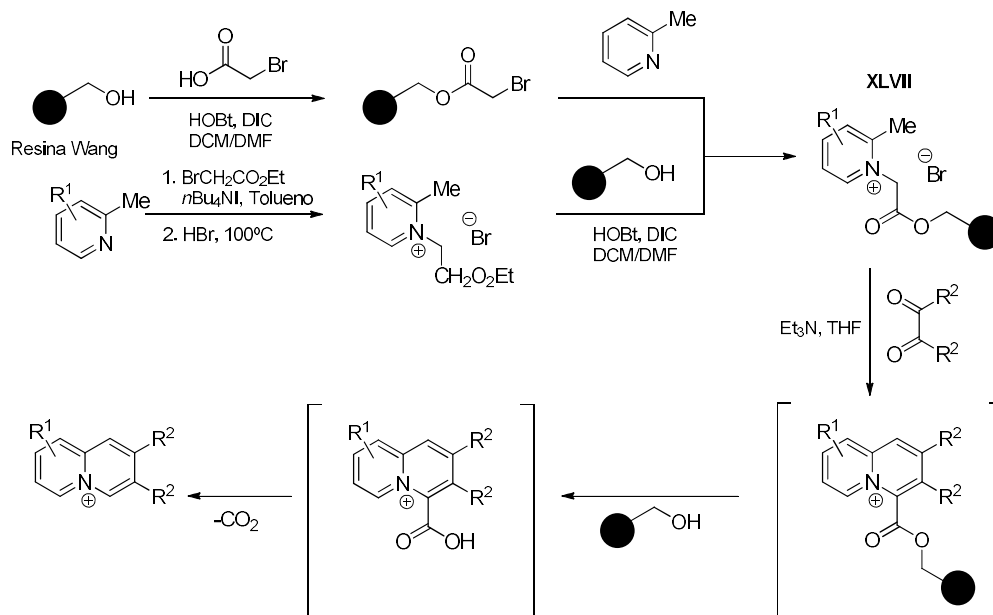
La condensación de Westphal ha demostrado ser útil también, en la preparación de resinas de intercambio iónico.²³⁶ El sustrato polimérico (**XLV**) unido a la 2-metilpiridina se hizo reaccionar con bromoacetato de etilo para dar la sal correspondiente la cual se condensó con la 2,3-butanodiona en presencia de di-*n*-butilamina para obtener el 2,3-dimetilquinolinizinio incorporado en la resina (Esquema 41).



Esquema 41. Condensación de Westphal usada en la preparación de resinas de intercambio iónico

Basada en este precedente se llevó a cabo la condensación de Westphal en fase sólida.⁴⁸ Se puede preparar el sustrato apropiado **XLVII** de dos maneras distintas usando la resina Wang como soporte sólido para esta reacción. En un estudio de las condiciones óptimas de reacción se observa que para obtener buenos rendimientos hace falta que la condensación se lleve a cabo en THF a 70°C con 3 equivalente de trietilamina como base. Bajo estas condiciones de reacción el producto inicial de la condensación de Westphal es inestable y, espontáneamente, tiene lugar una hidrólisis del ester y descarboxilación del ácido resultante. Esta secuencia de

hidrolisis/descarboxilación se ha observado en la condensación de Westphal convencional como se ha observado en apartados anteriores.

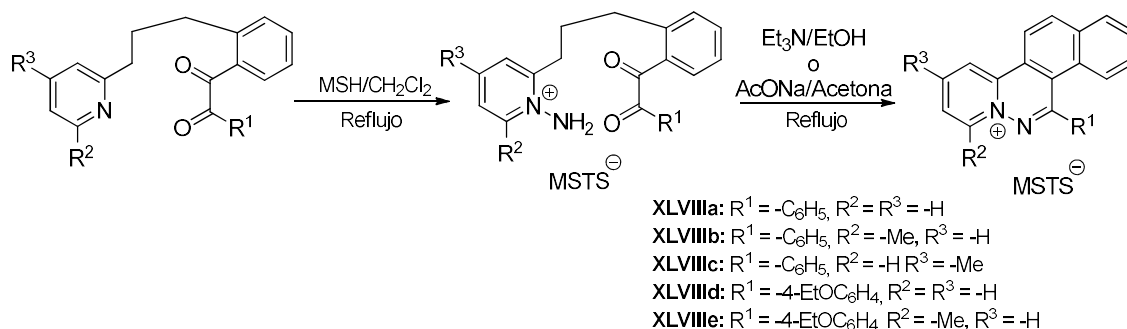


Esquema 42. Condensación de Westphal en fase sólida

3.3.1. Condensación de Westphal intramolecular

En estudios realizados en el grupo de investigación se exploró la condensación de Westphal intramolecular. En primer lugar, partiendo de un sustrato el cual posea un heterociclo nitrogenado y una dicetona en posiciones apropiadas, se realiza la cuaternización del nitrógeno heterocíclico usando MSH obteniendo las sales correspondientes con buenos rendimientos.

Los primeros experimentos realizados tuvieron como objetivo encontrar las mejores condiciones para la reacción. Se observó que, de manera análoga a la reacción intermolecular, las bases a utilizar fueron trietilamina y acetato de sodio en etanol o acetona respectivamente. En ambos casos las reacciones dieron como resultado mezclas de difícil separación del compuesto esperado y del compuesto totalmente oxidado. Sin embargo, aumentando los tiempos de reacción se obtuvo únicamente el compuesto **XLVIII** sin una aparente disminución de rendimiento.⁴⁹



Esquema 43. Condensación de Westphal intramolecular

Como resultado de un gran número de estudios y aplicaciones para la condensación de Westphal, se han podido establecer algunas conclusiones:

- La elección de la base y el disolvente y las condiciones de reacción juegan un papel muy significativo en el éxito de esta condensación.
- La reactividad del metileno en posición C1 está principalmente influenciada por la naturaleza del grupo electroattractor al que va unido, mientras que la reactividad del sustituyente α -alquílico dependen en gran medida del heterociclo y la presencia o ausencia de otros sustituyentes los que podrían estabilizar formas resonantes y ser estas las predominantes en el híbrido de resonancia haciendo el intermedio menos reactivo.
- La presencia de un fragmento carbonilo en el grupo unido al nitrógeno cuaternario normalmente resulta en una reacción con rendimiento más bajos debido a que en estos casos la reacción de Chichibabin es competitiva dando lugar a una ciclación y generando derivados de 2-indolizina.
- En la reacción de sales de azinio las cuales llevan unido al nitrógeno un resto etoxycarbonilmetil y 1,2-dicetonas, el grupo éster se perdió en la mayoría de los casos en el quinolizinio aislado. Se ha demostrado que la hidrólisis y posterior descarboxilación es un proceso sencillo si la sal de quinolizinio resultante es parcialmente soluble en el medio de reacción, de lo contrario el grupo éster permaneció en el producto de condensación.

Se observa que mediante esta estrategia sintética se permite la obtención de derivados catiónicos en pocos pasos y con buenos rendimientos. La versatilidad de esta reacción radica

en la variedad de compuestos 1,2-dicarbonílicos que pueden ser usados como dielectrófilos pudiendo incorporar , en un solo paso, un gran número de ciclos fusionados al sistema.

Discusión de resultados

1. Ampliación de la quimioteca de cationes heteroaromáticos tipo *azonia*

1.1. Síntesis de cationes tipo *azonia*

1.2. Síntesis de cationes derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio

1.3. Síntesis de cationes derivados de piridoimidazopiridazinio

1.3.1. Cationes dibenzopiridoimidazocinolinio no sustituidos

1.3.2. Cationes dibenzopiridoimidazocinolinio sustituidos

2. Curvas de desnaturalización de ADN

3. Caracterización fotofísica

3.1. Quimioteca de cationes tipo *azonia*

3.2. Cationes derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio

3.3. Cationes derivados de piridoimidazopiridazinio

3.3.1. Derivados de dibenzoimidazocinolinio no sustituidos

3.3.2. Derivados de dibenzoimidazocinolinio sustituidos

4. Estudios de unión con ADN de timo bovino

4.1. Cationes heteroaromáticos tipo *azonia* **4**, **8** y **11**

4.1.1. Valoración de fluorescencia con ADN de timo bovino

4.1.2. Tiempos de vida media en presencia de ADN de timo bovino

4.1.3. Dicroísmo circular

4.2. Cationes derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio

4.2.1. Valoración de fluorescencia con ADN de timo bovino

4.2.2. Dicroísmo circular

4.3. Cationes derivados de piridoimidazopiridazinio no sustituidos

4.3.1. Valoraciones de fluorescencia de derivados no sustituidos de piridoimidazopiridazinio con ADN de timo bovino

4.3.2. Medidas de tiempo de vida media en presencia de ADN de timo bovino

4.3.3. Dicroísmo circular

4.4. Cationes derivados de piridoimidazopiridazinio sustituidos

4.4.1. Valoración de fluorescencia de derivados sustituidos de piridoimidazopiridazinio con ADN de timo bovino

4.4.2. Tiempos de vida media en presencia de ADN de timo bovino

4.4.3. Dicroísmo circular

5. Mecánica y dinámica molecular

5.1. Estudio de los ligandos **4** y **11**

5.2. Estudio de los ligandos **40** y **41**

5.3. Estudio de los ligandos **53** y **56**

6. Estudios en células vivas

6.1. Actividad antiproliferativa: ensayo de MTT

6.2. Tinción celular. Microscopía confocal

El siguiente trabajo de investigación es una continuación del trabajo que ha venido realizando nuestro grupo de investigación en los últimos años sobre una quimioteca de compuestos catiónicos tipo *azonia* y se resume en la figura 46. En este trabajo se amplió y estudió dicha quimioteca con el objetivo de identificar aquellas moléculas capaces de aumentar su fluorescencia tras un proceso de intercalación con ADN, condición necesaria para que dichas moléculas puedan comportarse como sondas de esta biomolécula.

Los compuestos sintetizados fueron inicialmente sometidos a un cribado según su capacidad para la unión al ADN. Una vez comprobada esta característica, se estudiaron la fluorescencia así como las variaciones en la misma tras interaccionar con el ADN con el objetivo de seleccionar aquellos compuestos con un mejor perfil en intensidad de fluorescencia para ser usados como sondas de ADN. Mediante técnicas fotofísicas y computacionales se estudió también el modo de unión de los ligandos al ADN, seleccionando aquellos que presentasen la intercalación como forma preferente de unión.

Los compuestos que presentaban las mejores propiedades fueron objeto de modificaciones estructurales mediante la incorporación en su estructura de sustituyentes con libertad de giro. La finalidad de esta modificación era modular la fluorescencia del compuesto obteniendo ligandos con una baja intensidad de fluorescencia intrínseca. Estos compuestos podrían experimentar un aumento notable en la intensidad de fluorescencia una vez intercalados entre los pares de base del ADN debido a que no podrían desactivarse desde el estado excitado por vías que no fuesen mayoritariamente radiantes, como ya se ha mencionado en apartados anteriores.

Paralelamente a todo este proceso de selección de cromóforos, los compuestos capaces de unirse al ADN también fueron evaluados como agentes antiproliferativos frente a células tumorales. Por otro lado se estudió mediante microscopía confocal la potencialidad de estos ligandos para ser usados en tinción celular.

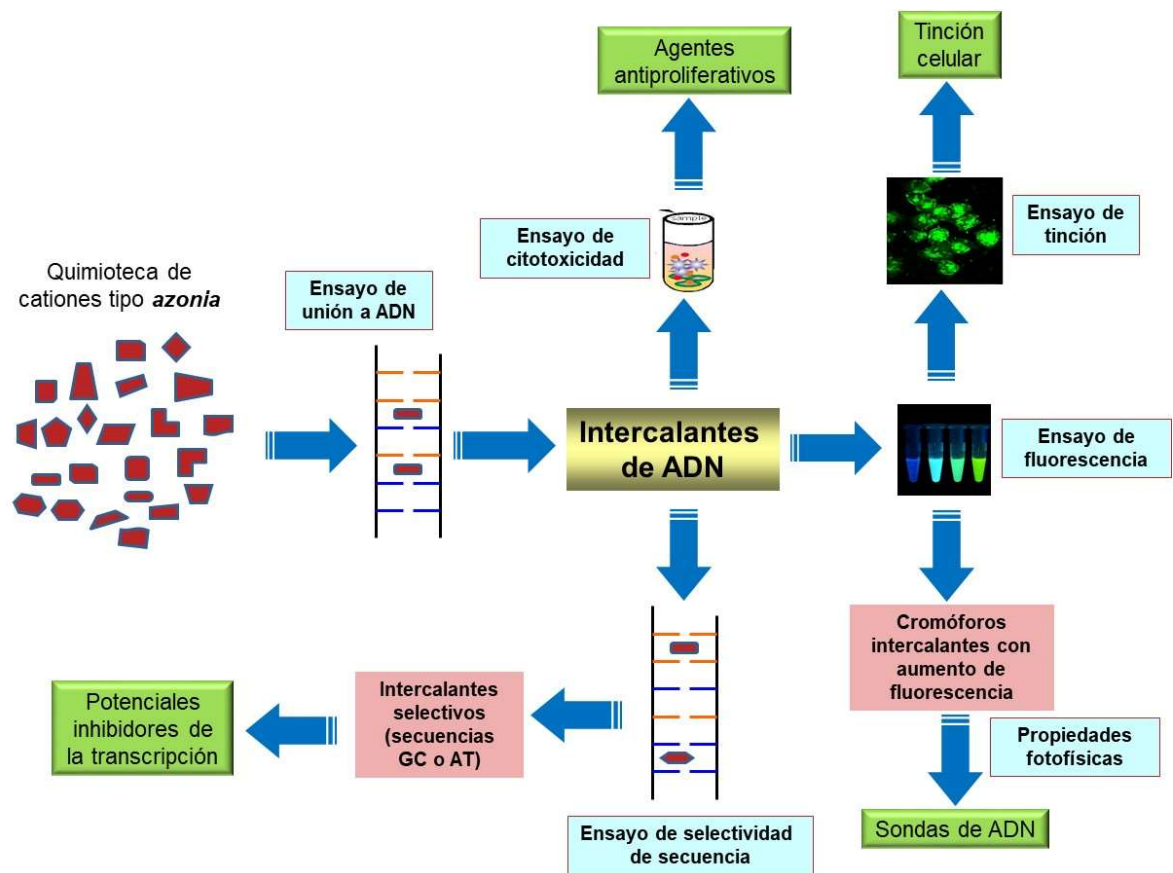


Figura 46. Esquema de trabajo utilizado en la realización de esta tesis doctoral

1. Ampliación de la quimioteca de cationes heteroaromáticos tipo azonia

Como se ha comentado en las secciones de Introducción y Antecedentes, nuestro grupo de investigación cuenta con una larga trayectoria en la síntesis de compuestos catiónicos heterocíclicos aromáticos con un nitrógeno cuaternario en posición cabeza de puente y el estudio de sus propiedades como intercalantes de ADN. Dentro de esta línea de trabajo, recientemente se realizó un estudio comparativo sobre la quimioteca de cationes tipo *azonia* que se ha generado durante años en el grupo. El objetivo era obtener información sobre la capacidad de interacción de estos compuestos con el ADN y su posible selectividad por oligonucleótidos ricos en los pares de bases nitrogenadas GC o AT. De esta forma, mediante ensayos de relajación de plásmido y la observación de cambios en la temperatura de desnaturalización de las hebras en los oligonucleótidos, se analizó la interacción con ADN de cromóforos derivados de carbolina, azolodiazina, piridoimidazol, benzimidazol y benzotiazol.⁶⁴

En esta parte del trabajo de investigación se realizó la ampliación de la quimioteca de cationes heteroaromáticos generada por nuestro grupo de investigación. Para la obtención de las moléculas incluidas en este trabajo se siguió una estrategia similar para todas ellas consistente en la selección de un heterociclo nitrogenado sobre el que se llevaron a cabo procesos de *N*-aminación y/o *N*-alquilación y las sales obtenidas se emplearon como dinucleófilos para la posterior condensación de Westphal con compuestos 1,2-dicarbonílicos. De esta forma se generaron las distintas series recogidas en este apartado. Posteriormente, los cromóforos seleccionados en la búsqueda de derivados capaces de modular las propiedades de fluorescencia y unión del ligando al ADN, se modificaron mediante la introducción de sustituyentes utilizando para ello reacciones de sustitución nucleófila aromática y reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio.

El apartado sintético de la discusión de resultados de este trabajo se divide en tres secciones que se han establecido en base al tipo de cationes obtenidos y del sistema heterocíclico del que derivan los mismos.

- Síntesis de cationes tipo *azonia*
- Síntesis de cationes derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio
- Síntesis de cationes derivados de piridoimidazopiridazinio

1.1. Síntesis de cationes tipo azonia

Con el objetivo de completar un estudio comparativo, en este apartado se detalla la síntesis realizada para ampliar una pequeña quimioteca de ocho cationes heteroaromáticos con el objetivo de evaluar la importancia que su tamaño, forma y distribución de carga tiene en el proceso de intercalación y establecer cuáles de estos compuestos presentan mejores propiedades de unión al ADN. Los compuestos a estudiar se muestran en la figura 47. Los cationes **1-4** están basados en el sistema de quinolininio fusionado con subunidades benzo-, dibenzo-, nafto- e indolo-; **5-7** en núcleos de azaquinolininio y, por último, **8-12** comparten la unidad azoloazinio como fragmento catiónico. Ninguno de ellos presenta sustituyentes en su estructura, con el objetivo de que se pueda evaluar el comportamiento de cada sistema heterocíclico y posteriormente seleccionar aquellos que presenten las propiedades más interesantes de cara a posteriores modificaciones estructurales.

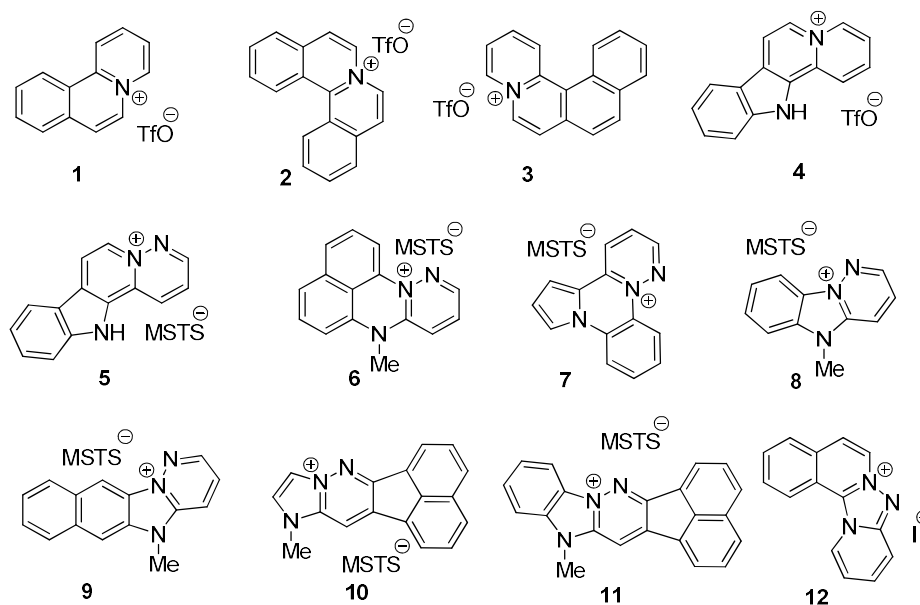


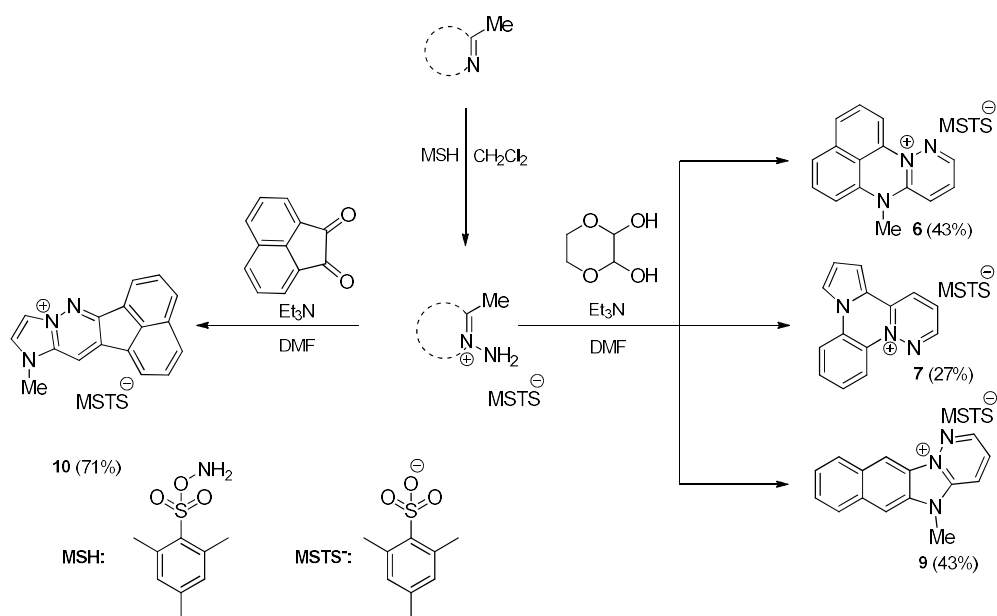
Figura 47. Cationes aromáticos con un nitrógeno cuaternario en posición cabeza de puente seleccionados para el estudio

Como se acaba de comentar, ocho de las sales seleccionadas habían sido sintetizadas previamente por nuestro grupo de investigación, bien por metátesis de cierre de anillo, bien por condensación de Westphal como pasos clave. De esta manera, los derivados **1-4** se

obtuvieron por la primera estrategia,⁵⁹⁻⁶² los azaquinolizinos **5** y **8** por condensación de Westphal utilizando 1,4-dioxano-2,3-diol (DODO)⁴⁶ como equivalente sintético de glioxal y **11** fue obtenido por condensación de la sal de cicloimonio correspondiente con acenaftoquinona.^{42, 174} Por último, el derivado de trisazoloisoquinolizino **12** se obtuvo por iodación de la *N*-(2'-piridil)aminida de isoquinolinio.²³⁷ Estas moléculas formaban parte de la quimioteca de compuestos catiónicos generada por nuestro grupo de investigación y no habían sido evaluadas aún como intercalantes de ADN.

Los compuestos **9**²³⁸ y **10**⁶⁹ también habían sido previamente sintetizados por nuestro grupo de investigación, si bien esta vez, dados los bajos rendimientos de reacción obtenidos en su momento, se decidió intentar mejorar su síntesis de cara a este estudio. Por último, los compuestos **6** y **7** fueron preparados expresamente para el presente trabajo.

Los cuatro cromóforos catiónicos **6**, **7**, **9** y **10** fueron sintetizados mediante la condensación de Westphal a partir de la sal de *N*-aminoazinio o azolio correspondiente con DODO o acenaftoquinona. A partir de los heterociclos 1,2-dimetil-1*H*-perimidina²³⁹, 4-metilpirrolo[1,2-*a*]quinoxalina²⁴⁰ y 1,2-dimetil-1*H*-nafto[2,3-*d*]imidazol²⁴¹ cuya síntesis se encuentra descrita, y el 1,2-dimetilimidazol, el cual es un reactivo comercial, se procedió a la *N*-aminación del nitrógeno heterocíclico con *O*-mesitilensulfonilhidroxilamina (MSH).²⁴² Estas reacciones de cuaternización fueron realizadas en diclorometano observándose la precipitación característica del compuesto catiónico resultante. La sal obtenida de la cuaternización del compuesto comercial 1,2-dimetilimidazol se hizo reaccionar con acenaftoquinona en presencia de trietilamina para obtener **10** con un buen rendimiento (71%). El resto de las sales de cicloimonio obtenidas fueron subsecuentemente tratadas con DODO, en presencia de trietilamina para obtener **6**, **7** y **9** con rendimientos globales de 27-43% (esquema 41).



Esquema 41. Síntesis de los derivados 6, 7, 9 y 10

1.2. Síntesis de cationes derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio

Teniendo en cuenta algunos estudios previos realizados sobre la quimioteca de cromóforos catiónicos,⁶⁴ se seleccionaron inicialmente los sistemas basados en los núcleos de benzoimidazopiridazinio (**13**) e imidazopiridazinio (**14**) (Figura 48) con el objetivo de conseguir derivados de los mismos capaces de aumentar su intensidad de fluorescencia al unirse al ADN y emplearse como sondas de tipo *light-up*.

A partir de los cationes escogidos se abordó la síntesis de una serie de derivados con modificaciones estructurales diseñadas para que la emisión de fluorescencia del cromóforo solo se produjese en entornos restrictivos que limitasen los cambios conformacionales, bien por razones estéricas bien por una elevada viscosidad. Para ello, se planteó la introducción de sustituyentes con libertad de giro que pueden actuar como “*interruptores*” de la emisión. La hipótesis inicial, por tanto, es que estos cambios estructurales serían capaces de provocar que el cromóforo no emita fluorescencia en entornos donde estos “*interruptores*” tengan libertad

de giro, ya que estos giros actúan como vías de desactivación no radiante, pero sí lo haga cuando el entorno la restrinja, en nuestro caso mediante el proceso de intercalación al ADN, ya que de esta forma se eliminan estas vías no radiantes y se provoca que la desactivación de la molécula se produzca a través de la emisión fluorescente.^{34, 3, 243}

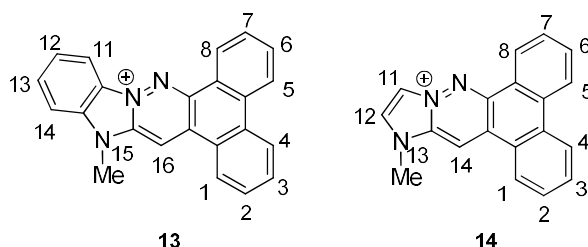
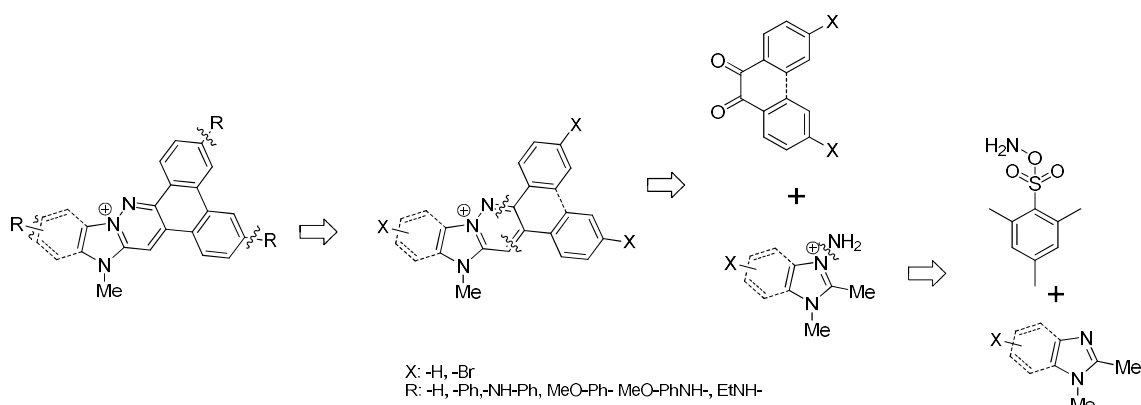


Figura 48. Sistemas basados en los núcleos de benzoimidazopyridazinio e imidazopyridazinio

Tomando como referencia ejemplos recientemente publicados, se seleccionaron aminas alifáticas y aromáticas^{34, 243, 244} y grupos arilo portando sustituyentes electrodonadores como los sustituyentes más adecuados para este conseguir este objetivo.

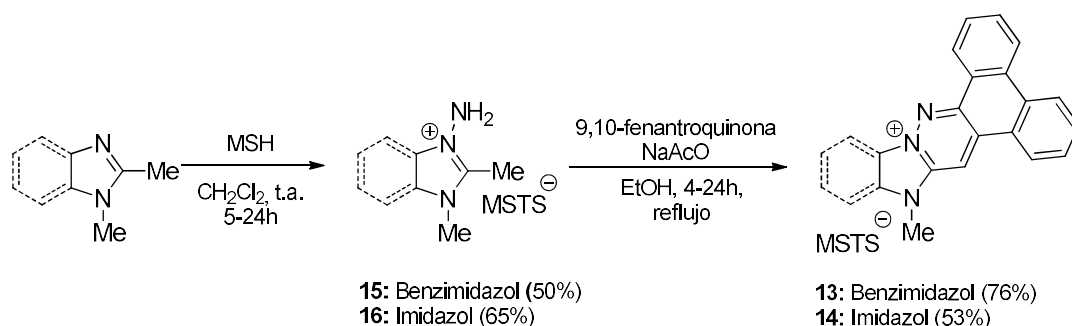
La introducción de estos sustituyentes generalmente requiere la funcionalización previa de las posiciones elegidas para la sustitución. La estrategia empleada se indica a continuación en el esquema retrosintético para los sistemas derivados de imidazopyridazinio y benzoimidazopyridazinio (esquema 42). Partiendo del heterociclo bromado o sin bromar, se aminoraría usando *o*-hidroxilaminamesitilensulfonato. La sal de azolio obtenida se haría reaccionar con un compuesto 1,2-dicarbonílico mediante la condensación de Westphal para dar los di- o tribenzoimidazocinolinios halogenados en los que, finalmente, se introduciría la amina mediante una reacción de sustitución nucleófila o los grupos arilos utilizando una reacción de Suzuki.

Teniendo en cuenta que no disponíamos de modelos fiables que mostrasen cuales eran las mejores posiciones de los cromóforos en los que la sustitución podría ser capaz de aumentar su fluorescencia en el proceso de intercalación, se optó por explorar distintas posiciones para realizar un estudio comparativo. Para ello se planteó funcionalizar las posiciones C3, C6 y C12 (ó C13) en el compuesto **13** o C3, C6 y C12 en el compuesto **14** (Figura 48). La razón de esta elección se basó en la facilidad de acceso a los heterociclos bromados que servirán como materiales de partida.



Esquema 42. Retrosíntesis para cationes derivados de imidazopiridazinio

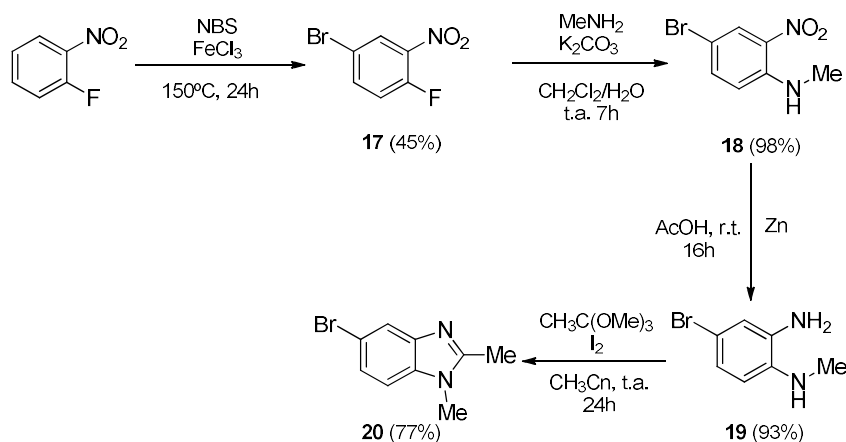
Siguiendo esta ruta sintética, los sistemas **13** y **14** fueron obtenidos empleando como heterociclos de partida 1,2-dimetilbenzimidazol²⁴⁵ y 1,2-dimetilimidazol. De esta manera, la N-aminación del nitrógeno en estos heterociclos usando MSH condujo a las sales de azolio **15** y **16**, con un 50% y un 65% de rendimiento, sobre las que posteriormente se procedió a realizar una condensación de Westphal con la 9,10-fenantroquinona, usando como base acetato de sodio, en etanol, para obtener los compuestos **13** y **14** con un 76% y un 53% de rendimiento, respectivamente (Esquema 43).



Esquema 43. Síntesis de **13** y **14**

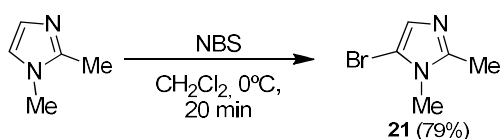
En cuanto a la síntesis de los cromóforos sustituidos por grupos amino y/o arilo, el primer paso en su ruta sintética pasaba por la obtención de los distintos heterociclos halogenados que iban a ser utilizados como materiales de partida. La síntesis del 5-bromo-1,2-dimetilbenzimidazol (**20**) se llevó a cabo a partir del reactivo comercial 1-fluor-2-nitrobenceno, el cual se bromó

usando NBS en presencia de tricloruro de hierro a 150°C durante 24 horas en tubo sellado, con lo que se obtuvo el bromonitrobenzenceno **17** con un 45% de rendimiento. Posteriormente, este derivado se hizo reaccionar con metilamina en presencia de carbonato potásico como base para dar el compuesto **18** con un 98% de rendimiento. Una vez se aisló esta amina, se procedió a reducir el grupo nitro usando zinc en ácido acético, con lo que se llegó, tras 16 horas de agitación, a la diamina **19** con un 93% de rendimiento. El último paso en esta ruta sintética fue la formación del anillo de imidazol usando ortoacetato de etilo y yodo. La reacción transcurrió con buen rendimiento dando como resultado el 5 bromo-1,2-dimetilbenzimidazol (**20**) con un 77% de rendimiento (esquema 44). El rendimiento global de esta ruta de 4 pasos fue del 30%.



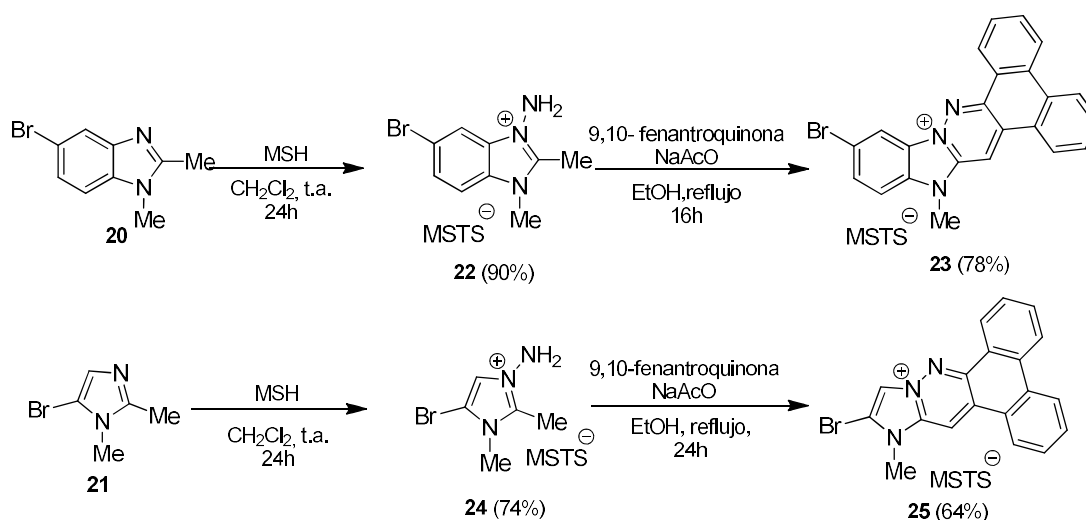
Esquema 44. Síntesis del derivado de benzimidazol **20**

La obtención del derivado bromado de imidazol **21** fue más sencilla ya que simplemente se hizo reaccionar el 1,2-dimetilimidazol con NBS.²⁴⁶ A pesar de que en los primeros intentos se obtuvo el derivado dibromado de 1,2-dimetilimidazol, ajustando los tiempos de reacción y la temperatura se consiguió controlar el proceso, obteniéndose el derivado monobromado **21** en posición C5 con un 79% de rendimiento (Esquema 45).



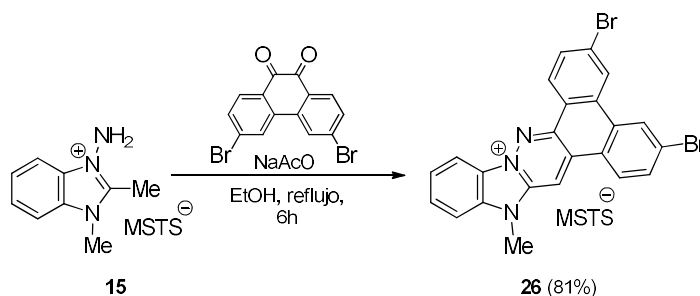
Esquema 45. Síntesis del derivado de imidazol **21**

La reacción de *N*-aminación de los heterociclos **20** y **21** se realizó usando MSH como reactivo aminante. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, en CH₂Cl₂, en el cual son solubles los heterociclos de partida pero no las sales, las cuales, precipitan en el medio de reacción. Una vez obtenidas las correspondientes sales de azolio con buenos rendimientos, se llevó a cabo la condensación de Westphal con estos sustratos. Para ello, se pusieron a reaccionar con 9,10-fenantroquinona usando como base acetato de sodio y etanol como disolvente. De esta manera, se obtuvieron los compuestos deseados **23** y **25** con buenos rendimientos (Esquema 46).



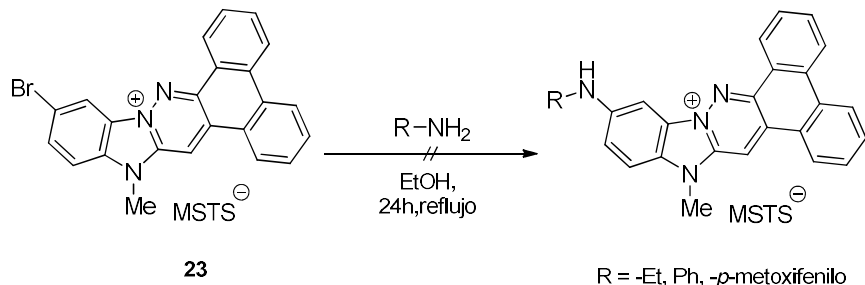
Esquema 46. Síntesis de los derivados **23** y **25**

Además, para obtener derivados de los compuestos **13** y **14** funcionalizados con bromo en otra posición, se pensó en emplear la 9,10-fenantroquinona bromada en posiciones C3 y C6²⁴⁷ en la condensación de Westphal. De esta manera, utilizando como sustrato el 3-amino-1,2-dimetilbenzimidazol **15** y el 3,6-dibromofenantreno-9,10-diona se llevó a cabo esta reacción, que duró 6 horas y se realizó usando etanol como disolvente y acetato sódico como base, para dar el compuesto **26** con un 81% de rendimiento (Esquema 47). Usando las mismas condiciones, a partir del compuesto **16**, se obtuvo el correspondiente derivado dibromado. Sin embargo, este se obtiene junto a otros productos de reacción, que forman una mezcla compleja, de la cual no pudo ser aislado después de varios intentos infructuosos.



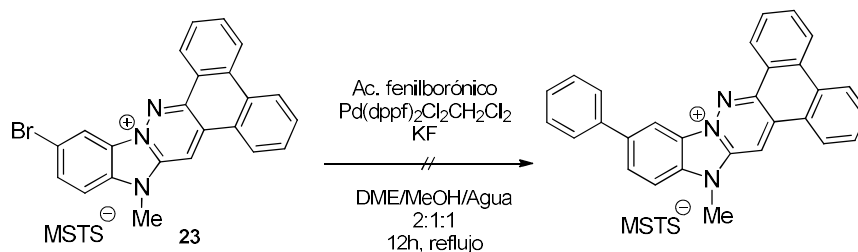
Esquema 47. Síntesis del derivado 26

Una vez obtenidos los cromóforos halogenados **23**, **25** y **26**, se procedió a incorporar en ellos los grupos amino y arilo. La síntesis de los derivados aminados se intentó mediante una sustitución nucleófila. Lo descrito en la bibliografía²⁴³ para otros sistemas tipo *azonia* es que esta reacción transcurría, en la mayoría de los casos, con rendimientos bajos. A pesar de ello, se intentaron adaptar estas condiciones usando como aminas etilamina, *p*-anisidina y anilina. Sin embargo, después de numerosos intentos no fue posible obtener los derivados aminados deseados. Las reacciones de las diferentes sales con las aminas cuando se siguieron por ¹H-RMN observándose, en la mayoría de los casos, la presencia mayoritaria de producto de partida sin reaccionar y productos de descomposición cuando se aumentaron los tiempos de reacción (Esquema 48).


 Esquema 48. Condiciones ensayadas para la obtención de derivados aminados de **13**.

Por otro lado, se procedió a ensayar las reacciones de Suzuki con el compuesto **23** para introducir en la molécula un sustituyente de tipo arilo. La reacción se llevó a cabo usando ácido fenilborónico, en presencia de fluoruro potásico y Pd(dppf)₂Cl₂CH₂Cl₂ como catalizador al 3%. La mezcla de reacción se mantuvo durante 12 horas a temperatura ambiente y refluxo. En estas condiciones se observó por ¹H-RMN la formación de una mezcla de productos donde el

mayoritario era el producto de partida (Esquema 49), pero no se detectó la formación del compuesto deseado.



Esquema 49. Condiciones ensayadas para la obtención de aril derivados de **13** por reacción de Suzuki

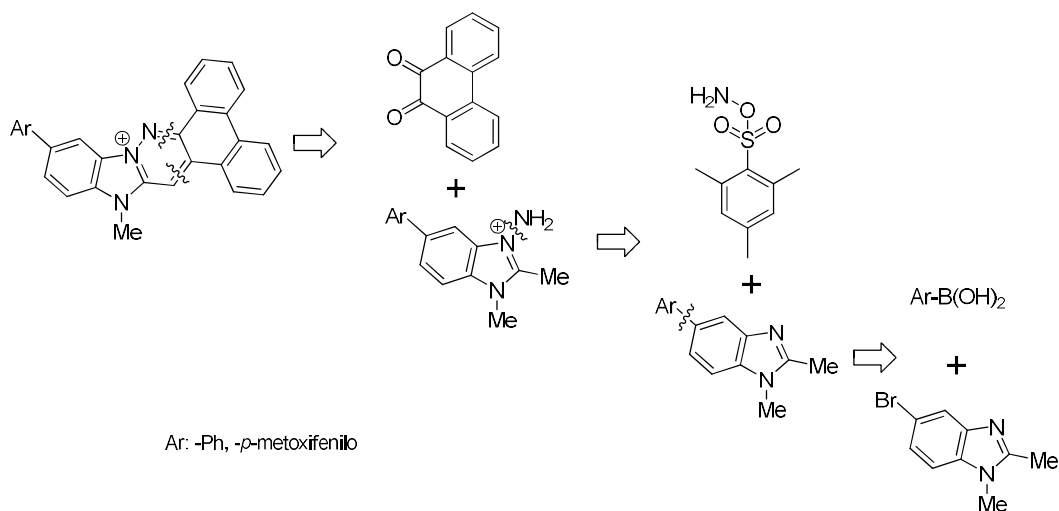
La reacción se ensayó en distintas condiciones que se resumen en la tabla 2. Se emplearon distintos ácidos borónicos y boratos, en presencia de otros catalizadores y a concentraciones variadas sin llegar a obtener, en ningún caso, el producto deseado, formándose en algunos casos mezclas de productos, siendo siempre el producto mayoritario el compuesto de partida **23**.

Tabla 2. Condiciones ensayadas en la reacción de acoplamiento de **23** con ácidos borónicos y boratos

		Catalizador	%	t (h)	T ^a	Rdto.
1	C ₆ H ₅ B(OH) ₂	Pd(dppf) ₂ Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂	3%	12h	Reflujo	---
2	C ₆ H ₅ B(OH) ₂	Pd(dppf) ₂ Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂	5%	36h	Reflujo	---
3	CH ₃ O-C ₆ H ₅ B(OH) ₂	Pd(dppf) ₂ Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂	5%	24h	Reflujo	---
4	C ₆ H ₅ BF ₃ K	Pd(OAc) ₂	1%	24h	Reflujo	---
5	C ₆ H ₅ BF ₃ K	Pd(OAc) ₂	3%	24h	Reflujo	---
6	C ₆ H ₅ BF ₃ K	Pd(OAc) ₂	10%	36h	Reflujo	---

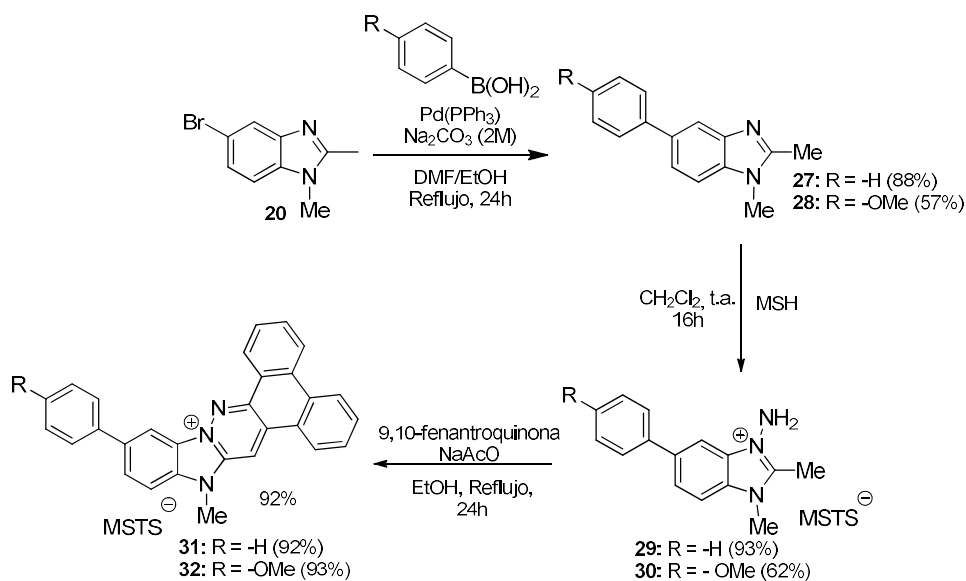
La imposibilidad de acceder a los productos finales deseados introduciendo el resto arilo en el último paso de síntesis, nos llevó a ensayar una estrategia sintética alternativa que se detalla en el esquema 50. En esta estrategia el primer paso sería la reacción de Suzuki usando como

sustrato el derivado bromado de 1,2-dimetilbenzimidazol. Posteriormente se aminaría el derivado arilado obtenido para dar la sal de azolio correspondiente. Por último, se llevaría a cabo la condensación de Westphal.



Esquema 50. Retrosíntesis alternativa para cationes derivados de imidazopiridazinio

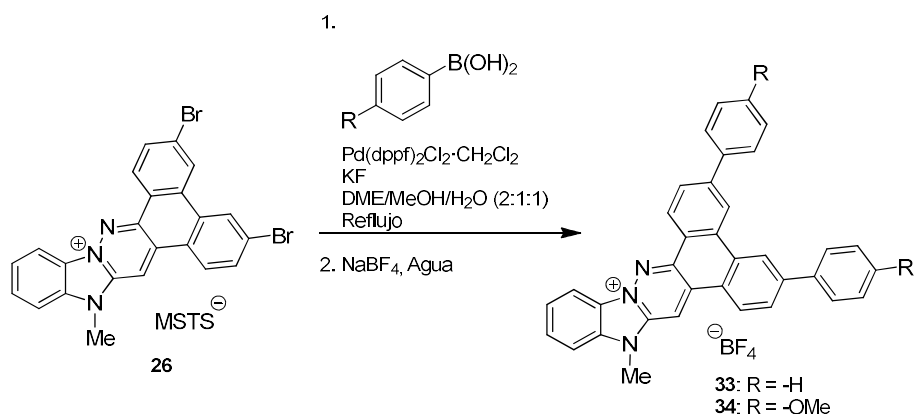
La síntesis se inició con el acoplamiento entre el 5-bromo-1,2-dimetilbenzimidazol (**20**) y ácido borónico en presencia de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ y carbonato sódico. Esta reacción se llevó a cabo en una mezcla de DMF y etanol, a reflujo, durante 24 horas para dar el derivado arilado **27** con un 88% de rendimiento. En estas mismas condiciones también fue obtenido **28** con un 57% de rendimiento al realizar el acoplamiento con el ácido *p*-metoxiborónico. A continuación se procedió a su *N*-aminación con MSH, obteniéndose las sales de azolio **29** y **30** con rendimientos del 93% y 62% respectivamente. Estas sales fueron usadas en la posterior condensación de Westphal con 9,10-fenantroquinona en presencia de acetato de sodio como base. La reacción transcurrió a reflujo durante 24 horas para dar los productos finales **31** y **32** con un 92% y un 93% de rendimiento respectivamente (Esquema 51).



Esquema 51. Síntesis de los derivados 31 y 32

También se intentó obtener el compuesto sustituido con un resto *p*-dimetilaminofenilo, pero la reacción de acoplamiento dio en este caso un rendimiento demasiado bajo para continuar la síntesis por esa ruta.

Una vez obtenidos los derivados arilados en la posición C12 se procedió a explorar la reacción de Suzuki para acceder a otros aril derivados. Para ello se empleó el derivado **26** para ensayar sobre él la reacción de acoplamiento. Esta reacción se llevó a cabo usando como catalizador $\text{Pd(dppf)}_2\text{Cl}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}_2$, al 3%, en presencia de fluoruro de potasio. Se emplearon tres ácidos borónicos (fenil, *p*-metoxifenil y *p*-dimetilaminofenil borónico) obteniéndose los derivados **33** y **34** con rendimientos del 61% y 73% respectivamente. Como se observa en la tabla 3, el correspondiente derivado de *p*-dimetilaminofenilo no pudo ser obtenido por este procedimiento (Esquema 52).



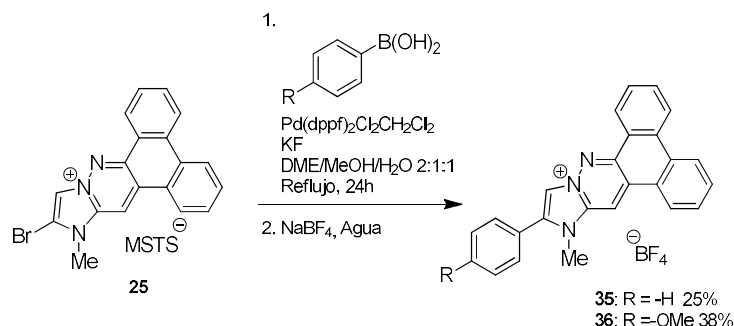
Esquema 52. Síntesis de los derivados 33 y 34

Tabla 3. Condiciones de reacción usadas en la obtención de los derivados 33 y 34

-R	Ac. Borónico	Eq.	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Rdto (%)
-H	C ₆ H ₅ B(OH) ₂	2	Reflujo	8	61%
-OMe	CH ₃ O- C ₆ H ₅ B(OH) ₂	2	Reflujo	10	73%
-NMe ₂	(CH ₃) ₂ N- C ₆ H ₅ B(OH) ₂	2	Reflujo	8	---
-NMe ₂	(CH ₃) ₂ N- C ₆ H ₅ B(OH) ₂	3	Reflujo	24	---

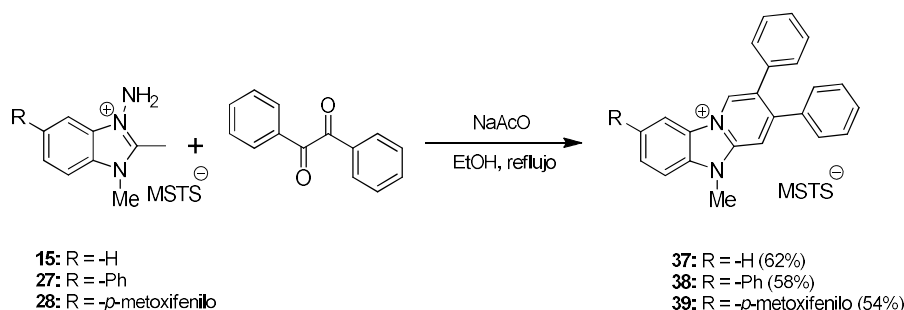
Por otro lado, a partir del derivado 25 se sintetizaron los derivados 35 y 36 mediante una reacción de Suzuki utilizando el ácido fenilborónico y el ácido *p*-metoxifenilborónico. Ambas reacciones se llevaron a cabo usando Pd(dppf)₂Cl₂·CH₂Cl₂ al 3% como catalizador, en presencia de KF y empleando como disolvente una mezcla 2:1:1 de DME, metanol y agua, durante 24 horas a reflujo. Se obtuvieron los correspondientes derivados 35 y 36 con unos rendimientos del 25% y 38% respectivamente (Esquema 53). Es de destacar la necesidad de proceder al cambio del

contraíón como último paso para de esta manera disminuir la solubilidad de la sal y conseguir su precipitación para purificar los compuestos finales.



Esquema 53. Síntesis de los derivados **35** y **36**

Por último, también se planteó realizar la condensación de Westphal utilizando como compuesto 1,2-dicarbonílico la difeniletanodiona. Aunque la molécula resultante solo tendría tres anillos fusionados, la posible extensión de la conjugación podría contribuir a mejorar la capacidad intercalante del cromóforo. Para esta condensación se usaron como sustratos el 3-amino-1,2-dimetilbenzimidazolio (**15**), el 5-fenil-3-amino-1,2-dimetilbenzimidazolio (**27**) y el 5-*p*-metoxifenil-3-amino-1,2-dimetilbenzimidazolio (**28**). La reacción se realizó en etanol, a reflujo, durante tiempos que variaron entre las 24 y las 72 horas. Se obtuvieron los productos **37-39** con rendimientos entre el 54% y 62% (esquema 54).



Esquema 54. Síntesis de los derivados **37**, **38** y **39**

En la figura 49 se incluyen los 14 cromóforos derivados de los sistemas de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio obtenidos. Algunos de estos cationes se han podido preparar incluyendo en su estructura sustituyentes en distintas posiciones del sistema heterocíclico. La libertad de giro de los sustituyentes y su carácter electrodonador confiere, a priori, a estos

compuestos las características necesarias para aumentar su fluorescencia en entornos restringidos y a longitudes de onda de emisión poco energéticas cercanas al rojo.

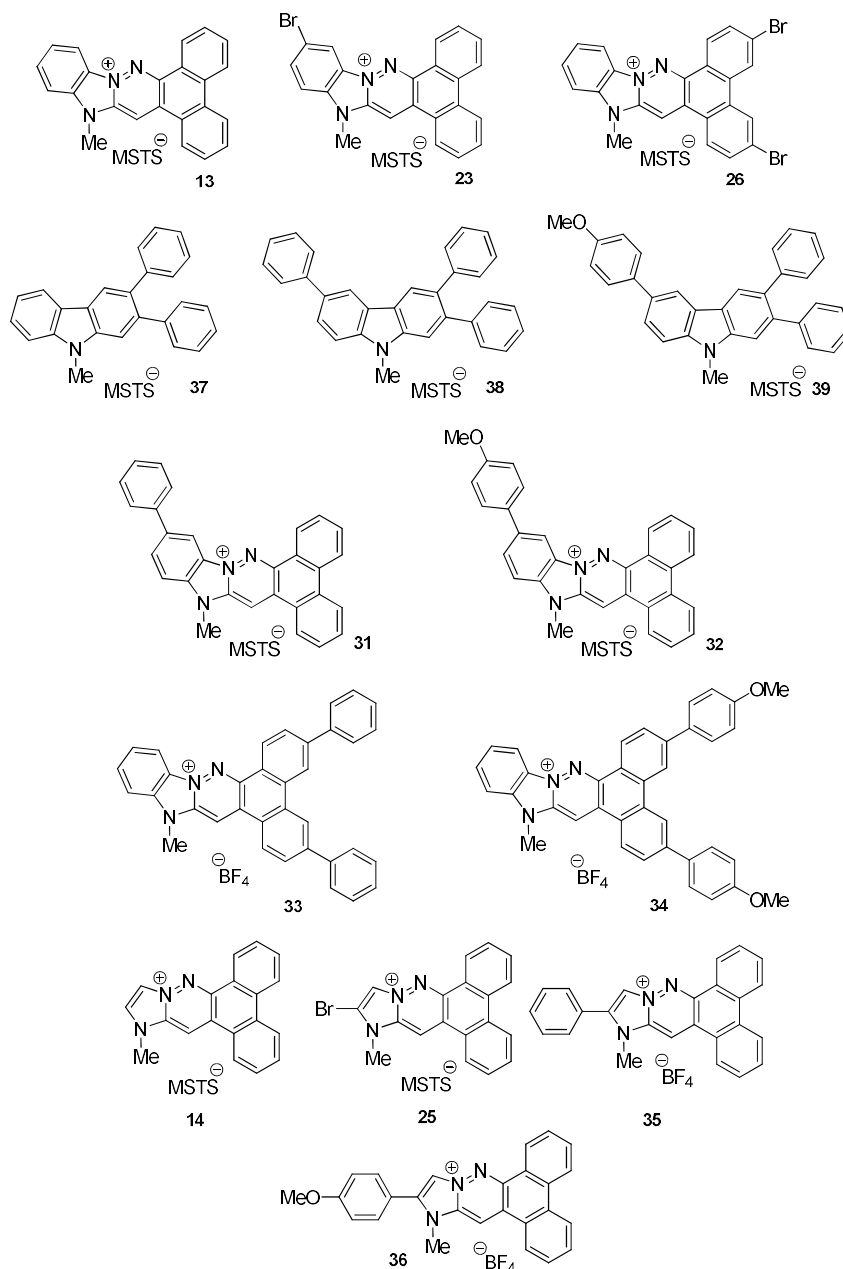


Figura 49. Serie obtenida de cromóforos derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio

1.3. Síntesis de cationes derivados de piridoimidazopiridazinio

1.3.1. Cationes dibenzopiridoimidazocinolinio no sustituidos

Estudios previos realizados en el grupo de investigación por la Dra. Verónica García en su tesis doctoral⁶⁴ condujeron a la selección del sistema de dibenzo[*f,h*]pirido[1',2':3,4]imidazo[1,2-*b*]cinolinio (**40**) (Figura 50) para explorar más exhaustivamente sus propiedades así como las de algunos de sus análogos. Al igual que en otros compuestos elegidos, la selección estaba fundamentada en los resultados iniciales obtenidos en los ensayos de unión a ADN desarrollados previamente en el grupo de investigación (Figura 51).

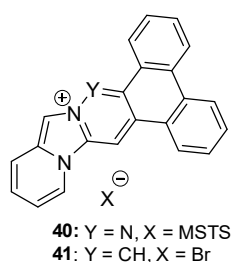


Figura 50. Sistemas **40** y **41**

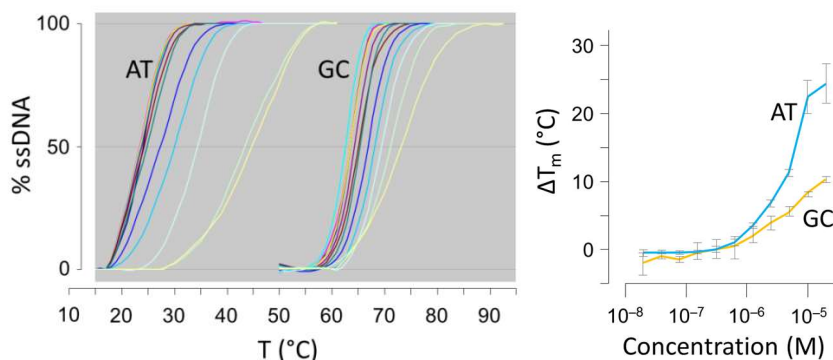
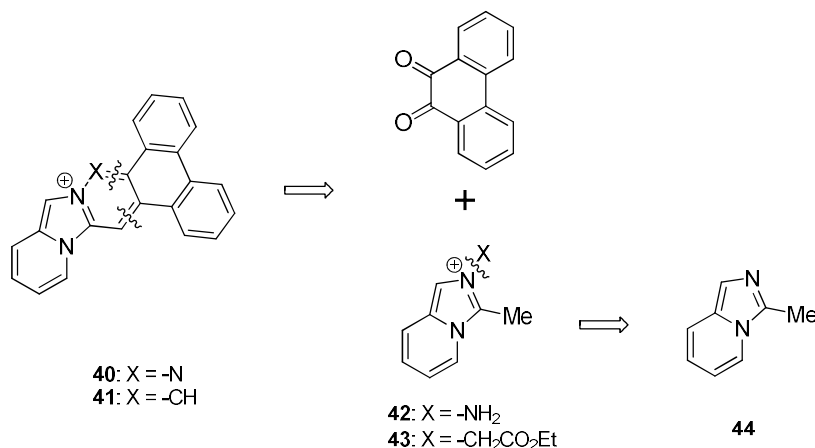


Figura 51. Curvas de desnaturalización (izquierda) y representación del aumento de temperatura experimental en función de la concentración de ligando representada en escala logarítmica (derecha) obtenidos para las mezclas de reacción del compuesto **40** y cadenas de oligonucleótidos de doble hélice con diferente composición de bases y secuencias. Oligonucleótido AT (línea azul) - 5'-CAATTAATATAAC-3' y su secuencia de bases complementarias. Oligonucleótido GC (línea naranja) - 5'-GCGCGGCGTCCGGCC-3' y su secuencia de bases complementarias. Cada punto obtenido es la media de dos experimentos separados. Concentraciones de ligando expresadas en mol/L: 1,95 x 10⁻⁸, 3,91 x 10⁻⁸, 7,81 x 10⁻⁸, 1,56 x 10⁻⁷, 3,13 x 10⁻⁷, 6,25 x 10⁻⁷, 1,25 x 10⁻⁶, 2,5 x 10⁻⁶, 5,0 x 10⁻⁶, 1,0 x 10⁻⁵ y 2,0 x 10⁻⁵

Mientras que la síntesis del compuesto **41** se llevó a cabo expresamente para la realización de esta tesis, el compuesto **40** ya había sido obtenido previamente en nuestro grupo de investigación,⁶⁹ si bien para este trabajo se llevó a cabo una optimización de dicha síntesis que se comenta a continuación y se presenta en su forma retrosintética (Esquema 55).

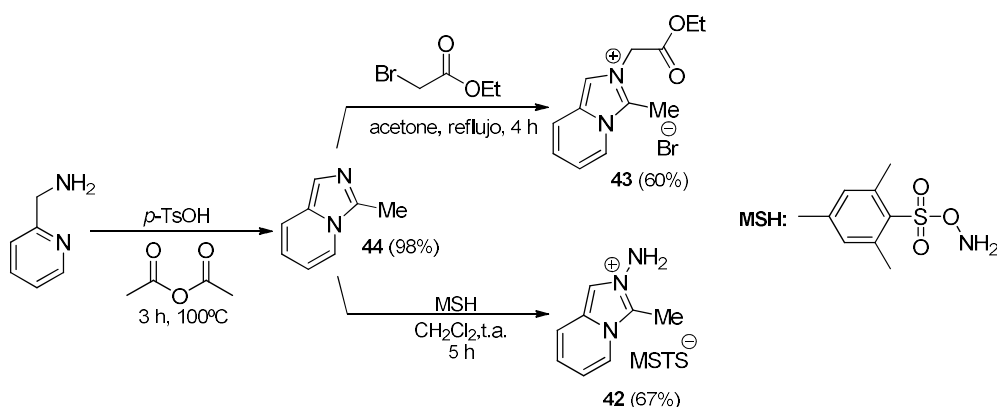
Ambos cationes objetivo se sintetizaron en tres pasos. El paso clave es una condensación de Westphal entre las correspondientes sales de azolio 1,2-disustituidas y 9,10-fenantroquinona.



Esquema 55. Retrosíntesis para cationes derivados de piridoimidazopiridazinio

El primer paso de ambas síntesis consistió en el tratamiento del reactivo comercial 2-aminometilpiridina con anhídrido acético y ácido *p*-toluensulfónico para obtener la metilimidazopiridina **44**.²⁴⁸ Esta reacción se llevó a cabo a 100°C durante 3 horas y rindió el heterociclo esperado de forma casi cuantitativa.

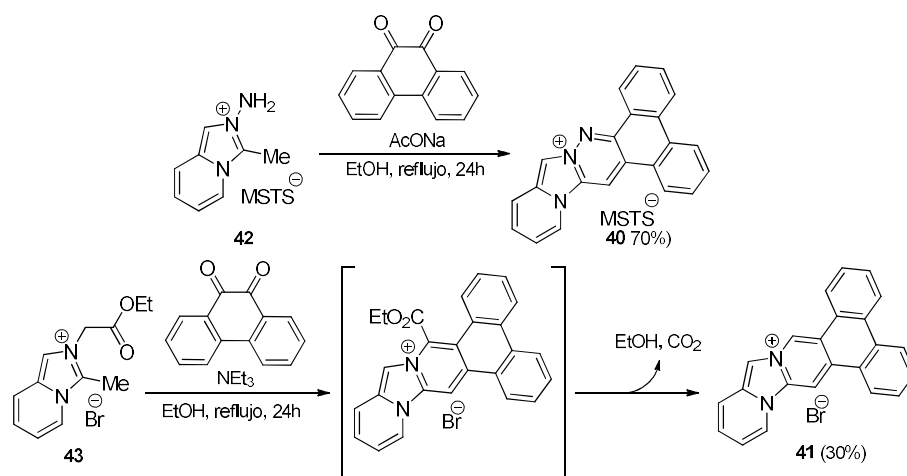
Posteriormente, se obtuvieron las sales de azolio **42** y **43** a partir de la metilimidazopiridina **44**, mediante aminación con MSH,²⁴² en CH₂Cl₂, para dar el derivado **42** o por alquilación usando bromoacetato de etilo en acetona para dar **43** (Esquema 56). En ambos casos, al finalizar la adición de los reactivos aminantes o alquilantes se observó la aparición de un precipitado de la correspondiente sal insoluble en el medio de reacción.



Esquema 56. Síntesis de las sales de azolio **42** y **43**

Por último, mediante una condensación de Westphal, las sales de azolio **42** y **43** se hicieron reaccionar con la 9,10-fenantroquinona en presencia acetato de sodio como base y etanol como disolvente. De esta forma, se obtuvo el dibenzopiridoimidazocinolinio **40** a partir del compuesto **42** con un rendimiento del 70%. En el caso de la sal **43**, en cambio, no se logró aislar el compuesto deseado **41** después de 48 horas con las mismas condiciones. Por ello, se ensayó como base alternativa la trietilamina,⁷⁰ lo que condujo a la formación de **41** con un rendimiento del 30%. Cabe resaltar que este rendimiento se corresponde con el producto aislado de la reacción, cuya formación implica la reacción de condensación, la hidrólisis del ester y la descarboxilación del ácido carboxílico (o carboxilato) resultante.¹⁷⁴

El azacompuesto **40**, por tanto, se obtuvo con un rendimiento global del 46% desde el reactivo comercial 2-aminometilpiridina, mientras que el cromóforo **41** se logró con un 18% (Esquema 57).



Esquema 57. Reacción de Westphal para la obtención de los compuestos **40** y **41**

1.3.2. Cationes dibenzopiridoimidazocinolinio sustituidos²⁴⁹

Tras comprobar la capacidad como intercalante del catión dibenzopiridoimidazocinolinio **40**, así como sus buenas propiedades de fluorescencia, como se detallará en los apartados siguientes, se procedió a sintetizar derivados del mismo ensayando los mismos tipos de sustitución ya mencionados anteriormente para los cationes derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio.

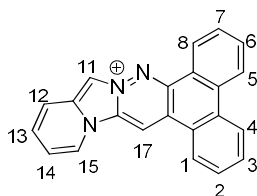


Figura 52. Estructura del sistema de dibenzopiridoimidazocinolinio **40**

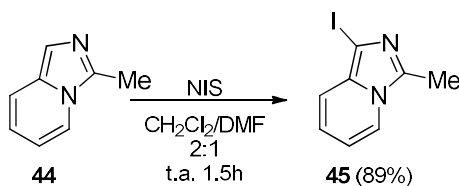
En este caso, se pensó en sustituir las posiciones C3, C6, C11 y C14 (Figura 52) con aminas aromáticas tales como anilina o *p*-anisidina y grupos como fenilo y arilos llevando grupos electrodonadores como *p*-metoxifenilo y *p*-dimetilaminofenilo. La elección de estas posiciones vino fundamentada principalmente por su accesibilidad sintética.

El esquema retrosintético para estos derivados del catión dibenzopiridoimidazocinolinio **20** se detalla a continuación (Esquema 58). Partiendo de la 3-metilimidazo[1,5-*a*]piridina bromada en la posición C6 (**48**) o iodada en la posición C1 (**45**), se obtendría la sal de azolio correspondiente, la cual, mediante la condensación de Westphal con fenantroquina daría lugar al derivado de dibenzopiridoimidazocinolinio funcionalizado en las posiciones C11 y C14. Por otro lado, partiendo del heterociclo **44**, mediante aminación usando MSH se obtendría el intermedio **42**, el cual, por condensación de Westphal con la fenantroquina dibromada daría el derivado de dibenzopiridoimidazocinolinio bromado en las posiciones C3 y C6. Una vez obtenidos los productos funcionalizados en las posiciones C3, C6, C11 y C14 se procedería a la introducción de los sustituyentes.



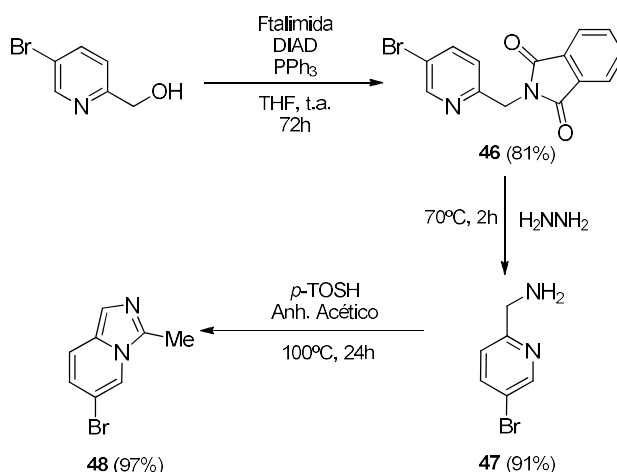
Esquema 58. Esquema retrosintético para la síntesis de los cationes derivados de piridoimidazocinolinio

El primer paso de esta síntesis, por tanto, implica la obtención de las imidazopiridinas halogenadas **45** y **48**. La 1-iodo-3-metilimidazo[1,5-*a*]piridina (**45**) se obtuvo con un 89% de rendimiento mediante la iodación de la imidazopiridina con **44**²⁴⁸ con *N*-iodosuccinimida (NIS) a temperatura ambiente (Esquema 59).



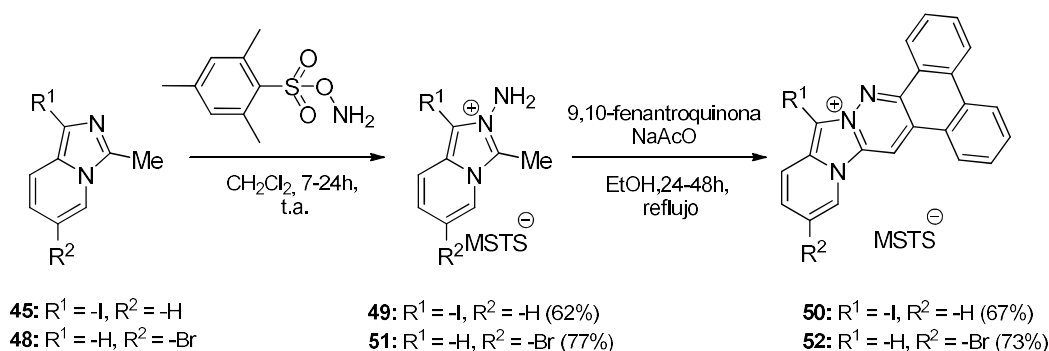
Esquema 59. Síntesis de la imidazopiridina iodada **45**

El procedimiento para la síntesis de la 6-bromo-3-metilimidazo[1,5-*a*]piridina (**48**) (Esquema 60) emplea como producto de partida la 2-hidroximetil-5-bromopiridina, que se transforma en **46** mediante una reacción de Mitsunobu con ftalimida. La reducción de **46** con hidrazina condujo a la 2-aminometil-5-bromopiridina (**47**)²⁵⁰ con un 91% de rendimiento. La reacción de esta con ácido *p*-toluensulfónico y anhídrido acético, condujo a la formación de la imidazopiridina **48**²⁴⁸ con un 97% de rendimiento.



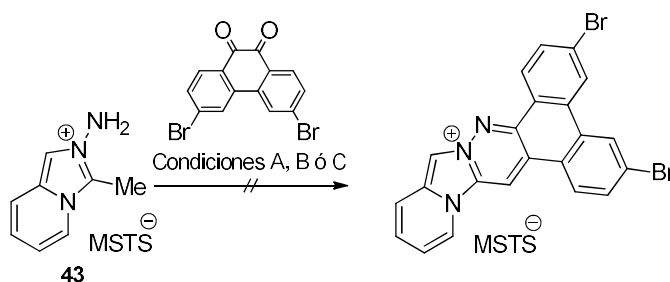
Esquema 60. Síntesis de la imidazopiridina bromada **48**

Estas haloimidazopiridinas se aminaron usando *O*-mesitilensulfonilhidroxilamina (MSH)²⁴² en diclorometano para dar las sales **49** y **51**, las cuales, por reacción con 9,10-fenantroquinona en presencia de acetato de sodio generaron los compuestos **50** y **52** halogenados en las posiciones C11 y C14, respectivamente (Esquema 61).



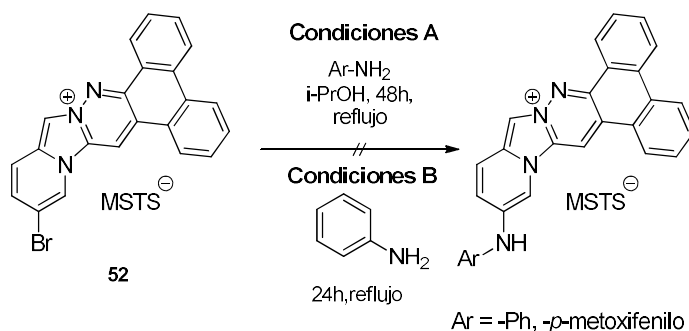
Esquema 61. Síntesis de los cromóforos **50** y **52**

La funcionalización de las posiciones C3 y C6 del catión dibenzopiridoimidazocinolinio, se intentó realizar mediante una condensación de Westphal entre la sal de azolio **43** y la 3,6-dibromofenantreno-9,10-diona (Esquema 62). Sin embargo, no se logró obtener el compuesto deseado con ninguna de las condiciones empleadas variando la base, el disolvente, la temperatura y el tiempo de reacción. En todos los intentos realizados se produjo la descomposición de la sal de azolio de partida.



Esquema 62. Condiciones ensayadas para la obtención del derivado dibromado de piridoimidazopiridazinio

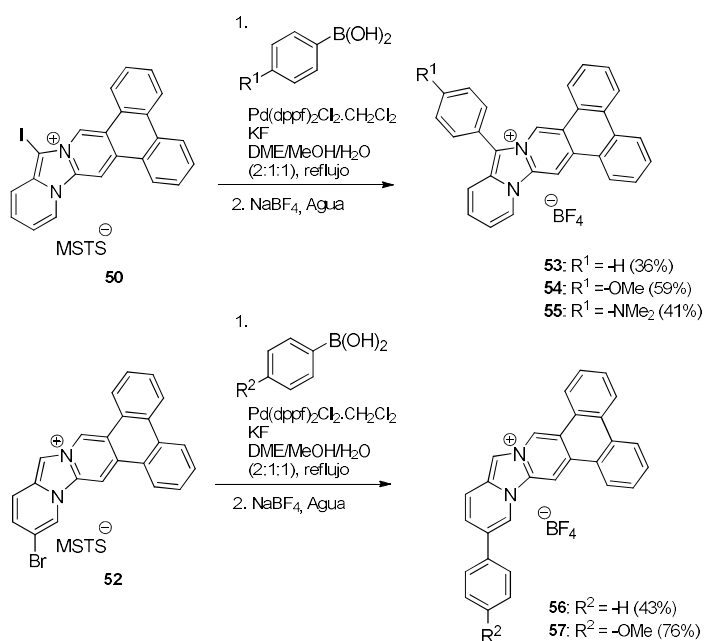
Cuando se ensayó la reacción de los compuestos **50** y **52** con aminas aromáticas, tampoco se pudieron obtener los productos de sustitución deseados. En los intentos realizados o bien se recuperaba el producto de partida o se producía la descomposición del mismo, especialmente cuando se empleaba la propia amina como disolvente (Esquema 63).²⁴³



Esquema 63. Condiciones ensayadas para la obtención de los arilamino derivados de piridoimidazopiridazinio

La obtención de los derivados arilados se llevó a cabo mediante una reacción de Suzuki usando los correspondientes ácidos borónicos, fluoruro potásico y cantidades catalíticas del complejo [1,1'-Bis(difenilfosfino)-ferroceno]dicloropaldio(II).²⁴⁴ De esta manera se obtuvieron los cromóforos **53-57** con rendimientos aceptables (Esquema 64). En todos los casos, el contraión (MSTs) tuvo que ser cambiado por tetrafluoroborato para facilitar el aislamiento y la purificación de los mismos. Para el caso de las reacciones de acoplamiento de Suzuki utilizando como sustrato el derivado iodado **50**, se observó la desaparición del producto de partida por ^1H -RMN. Sin embargo, en todos los casos se produjo la formación del producto deseado acompañado del producto de deshalogenación. Este problema sumado a la dificultad de aislamiento y purificación del producto deseado condujo a una disminución de los rendimientos de los mismos. El producto de acoplamiento entre **52** y el ácido *p*-dimetilaminofenilborónico no pudo aislarse en ninguna de las condiciones ensayadas.

La serie obtenida de derivados de dibenzopiridoimidazocinolinio se detalla en la Figura 53.



Esquema 64. Síntesis de los cationes 53-57

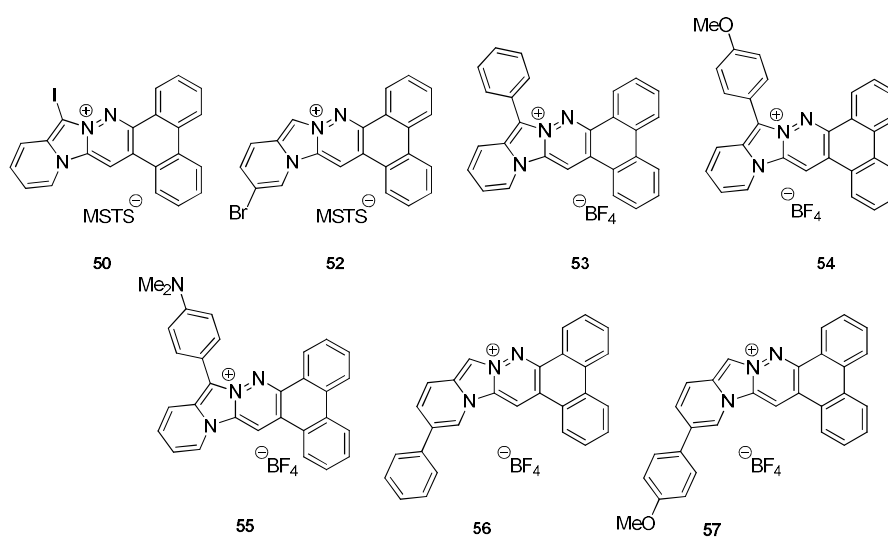


Figura 53. Serie obtenida de cromóforos derivados de dibenzopiridoimidazocinolinio

Como resumen de la parte sintética, se han obtenido 27 compuestos finales agrupados en 3 series en base al sistema heterocíclico resultante. Los compuestos sintetizados que presentan sustituyentes con libertad conformacional han sido obtenidos utilizando química de paladio. No se han podido obtener los derivados deseados mediante sustitución nucleófila aromática empleando aminas alifáticas y aromáticas.

A continuación se detallan los distintos estudios realizados con los compuestos sintetizados con el objetivo de profundizar en su caracterización y propiedades e identificar aquellos que presenten un mejor perfil como potenciales sondas fluorescentes de ADN.

2. Curvas de desnaturalización de ADN

Estos ensayos fueron realizados únicamente sobre los cationes del primer grupo de compuestos obtenidos en el apartado anterior (ver figura 47), aportando datos preliminares sobre las características en la unión de estos ligandos al ADN. Estos estudios se llevaron a cabo por el Dr. Alberto Domingo en el Departamento de Biología de Sistemas de la UAH mediante la técnica de desnaturalización térmica de ADN basada en FRET, usando oligonucleótidos sintéticos con secuencias definidas ricas en AT (5'-CAATTAAATATAAC-3') o en GC (5'-GCGCGCGTCCGGGCC-3'), que había empleado previamente durante la realización de la tesis doctoral de la Dra. Verónica García.⁶⁴

Los ensayos de unión a ADN mostraron que los compuestos **4**, **10** y **11** tienen una alta afinidad por esta biomolécula, mientras que los compuestos **2**, **3**, **5** y **6** presentan muy baja afinidad y que los compuestos **1**, **7**, **8**, **9** y **12** no se unen al ADN. Es interesante destacar que los compuestos que presentan buenas propiedades de unión al ADN mostraron una débil interacción con oligonucleótidos ricos en GC. Sin embargo, se pudo observar un rápido y elevado aumento en la temperatura de desnaturalización desde concentraciones bajas de ligando para el caso de oligonucleótidos ricos en AT, indicativo de la mayor afinidad de los ligandos por este tipo de secuencias.

A continuación, se muestran las gráficas de incremento de temperatura experimental vs concentración de ligando en una escala logarítmica (Figuras 54, 55, 56, 57) obtenido para los distintos compuestos y una doble hebra de oligonucleótidos de distinta composición de bases y secuencias. Estas gráficas muestran la media de los valores obtenidos en dos experimentos separados. Las curvas de los cationes que presentan mayor afinidad (**4**, **10** y **11**) se muestran con mayor detalle, mientras que el resto se recogen en una sola figura. Además, la tabla 4 recoge un resumen de los datos obtenidos.

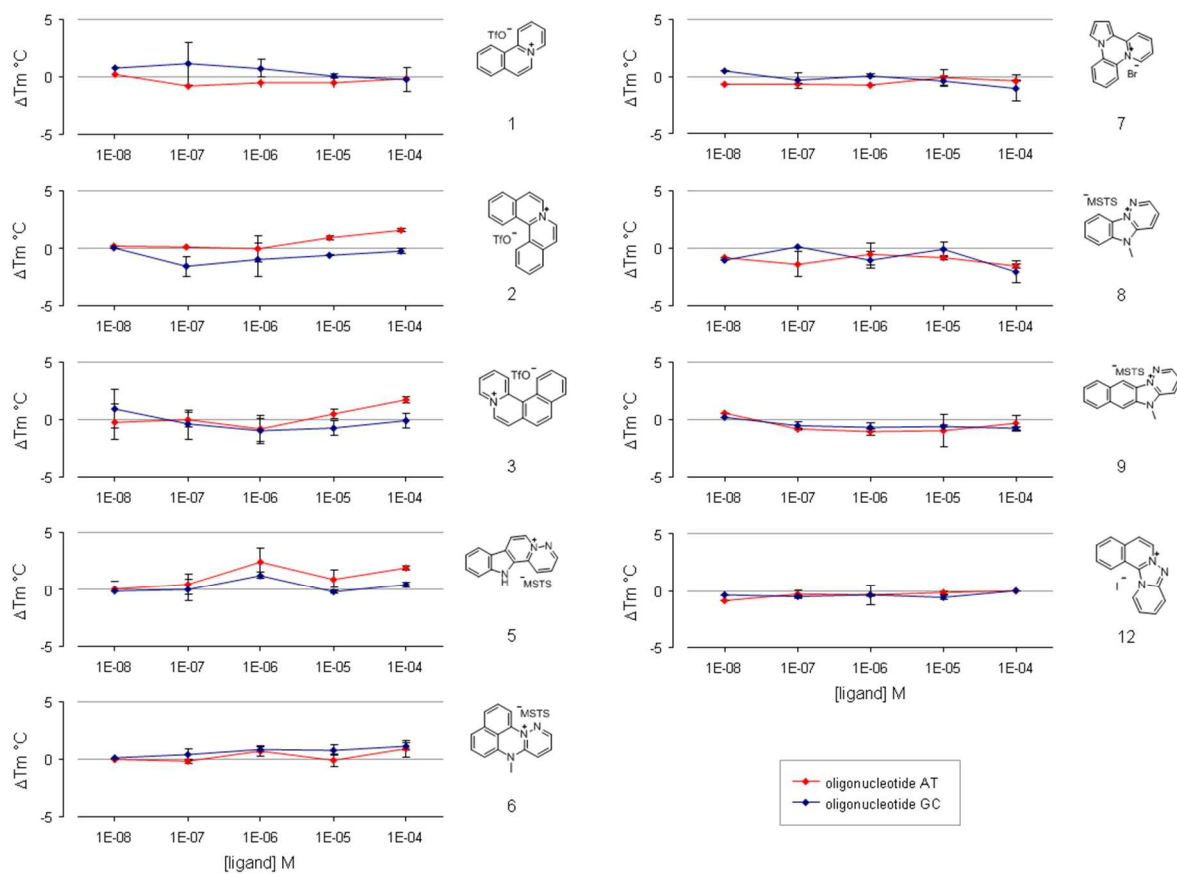


Figura 54. Gráficas de los aumentos de temperatura de desnaturalización obtenidos experimentalmente frente a la concentración del ligando en escala logarítmica obtenidos para los ligandos **1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9** y **12**

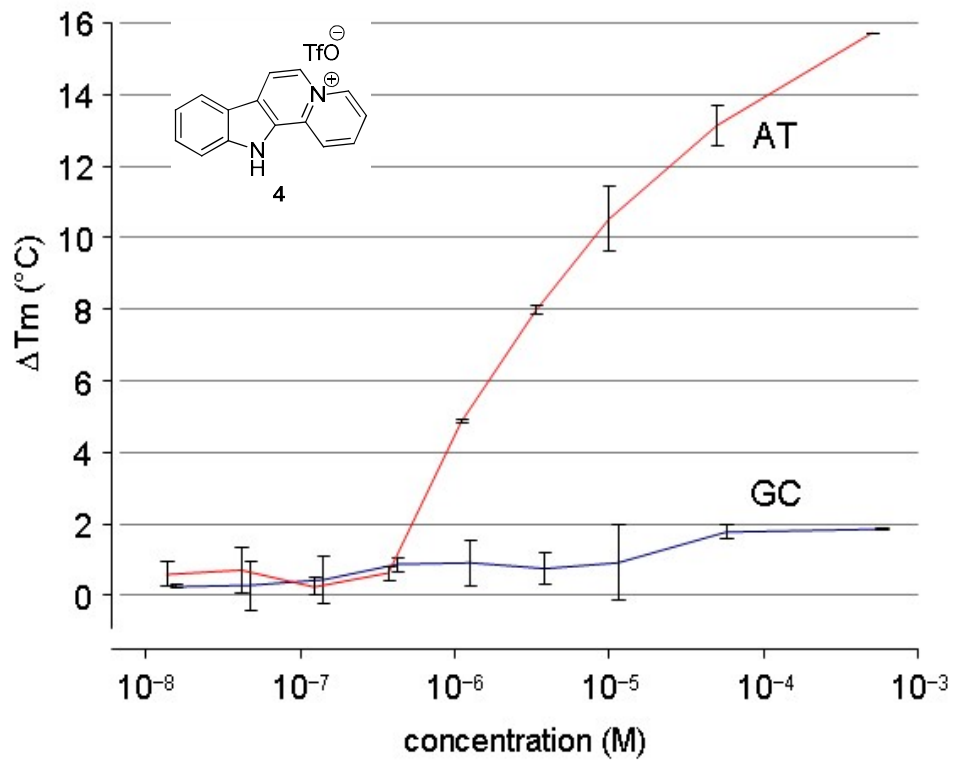


Figura 55. Gráfica del aumento de temperatura de desnaturalización experimental frente a la concentración del ligando 4 en escala logarítmica. Para visualizar mejor las desviaciones estándar, los puntos de la gráfica de GC se encuentran ligeramente desplazados a la derecha

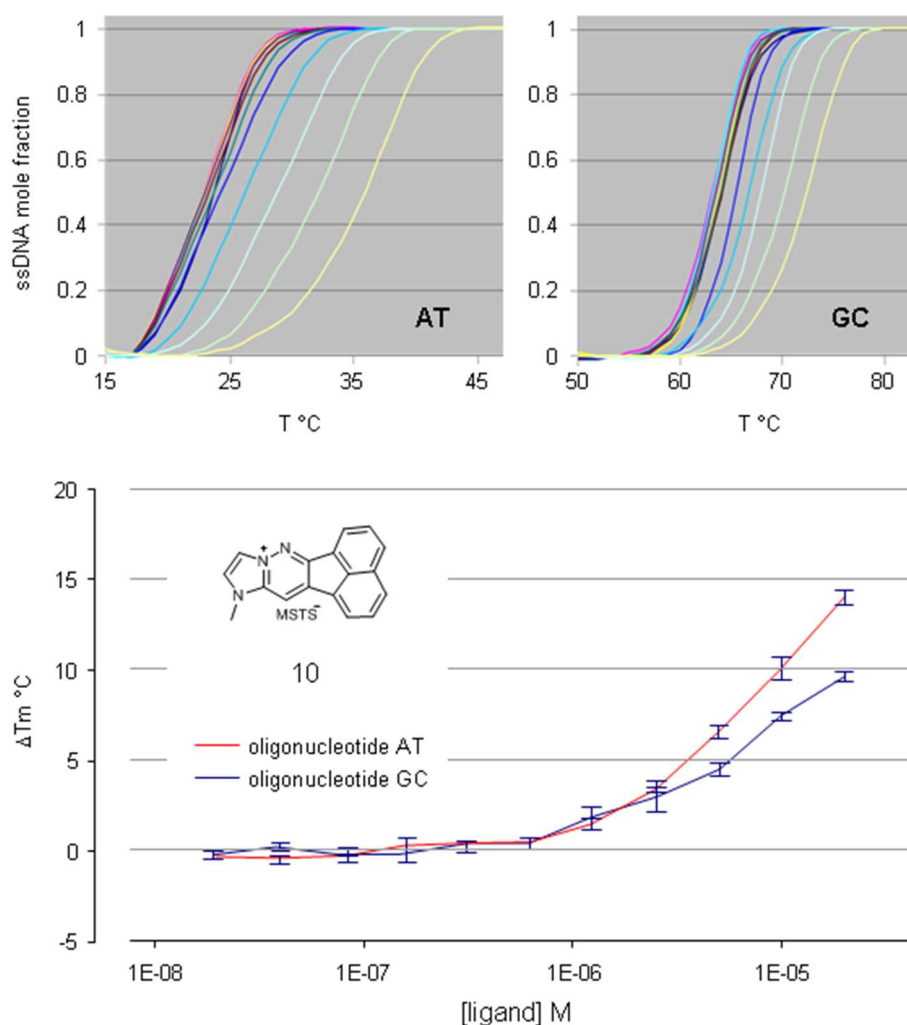


Figure 56. Curvas de desnaturalización (paneles superiores) y gráfica del incremento de temperatura experimental versus la concentración de ligando en una escala logarítmica (panel inferior) obtenido para las mezclas de reacción del compuesto **10** y una doble hebra de oligonucleótidos de distinta composición de bases y secuencias. Concentraciones de ligando (M): 1.95×10^{-8} , 3.91×10^{-8} , 7.81×10^{-8} , 1.56×10^{-7} , 3.13×10^{-7} , 6.25×10^{-7} , 1.25×10^{-6} , 2.5×10^{-6} , 5.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} y 2.0×10^{-5}

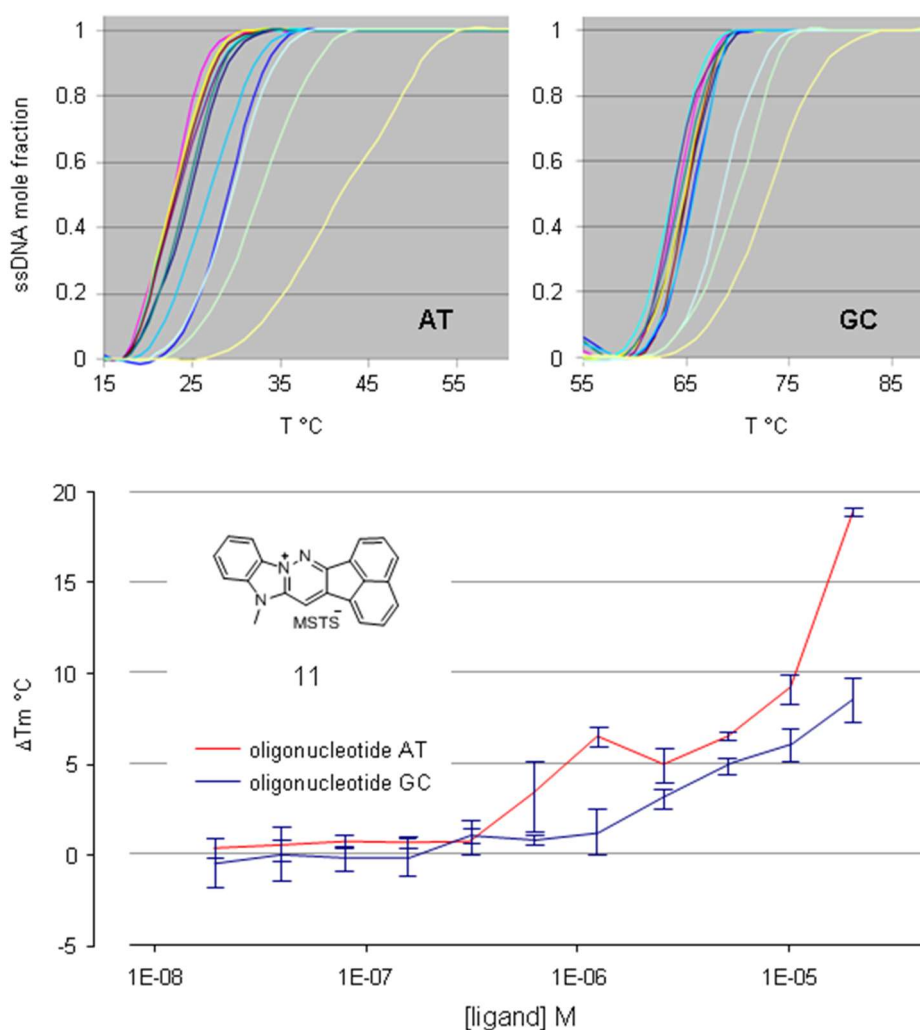


Figura 57. Curvas de desnaturalización (paneles superiores) y gráfica del incremento de temperatura experimental versus la concentración de ligando en una escala logarítmica (panel inferior) obtenido para las mezclas de reacción del compuesto **11** y una doble hebra de oligonucleótidos de distinta composición de bases y secuencias. Concentraciones de ligando (M): 1.95×10^{-8} , 3.91×10^{-8} , 7.81×10^{-8} , 1.56×10^{-7} , 3.13×10^{-7} , 6.25×10^{-7} , 1.25×10^{-6} , 2.5×10^{-6} , 5.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} y 2.0×10^{-5}

3. Caracterización fotofísica

Con el objetivo de conocer las características fotofísicas de los compuestos obtenidos, se llevaron a cabo los estudios necesarios para este fin, obteniéndose en primer lugar sus espectros de absorción. Estos compuestos pueden experimentar distintas transiciones, por lo que sus espectros de absorción UV-Vis presentan más de una banda. Las bandas de menor energía son atribuidas a la transición de transferencia de carga π - π^* , típicamente observada en sistemas altamente conjugados como pueden ser estas moléculas. El grado de conjugación de las mismas, así como el perfil donador o aceptor de sus sustituyentes, condiciona la posición de los máximos de absorción en los cationes estudiados, efecto que también puede observarse en los espectros de emisión, obtenidos posteriormente usando los máximos de absorción de menor energía, para determinar los máximos de emisión de los cromóforos. Los compuestos estudiados se agrupan siguiendo el criterio usado en el apartado anterior para una comparación más sencilla.

- Quimioteca de sistemas tipo *azonia*
- Cationes derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio
- Cationes derivados de piridoimidazopiridazinio

3.1. Quimioteca de sistemas tipo *azonia*

Como inicio del estudio fotofísico desarrollado sobre los doce cationes seleccionados, se obtuvieron sus espectros de absorción, mediante un barrido desde aproximadamente los 600 nm hasta, más o menos, 200 nm, empleando metanol como disolvente (figura 58). Debido a las distintas transiciones que pueden experimentar los electrones de estos compuestos, sus espectros de absorción presentaron distintas bandas, siendo las de baja energía atribuidas a la transición de transferencia de carga π - π^* característica de sistemas altamente conjugados. Como era de esperar, la localización de los máximos de absorción es sensible al grado de conjugación y al perfil donador o aceptor de electrones de los sustituyentes en los núcleos estudiados.

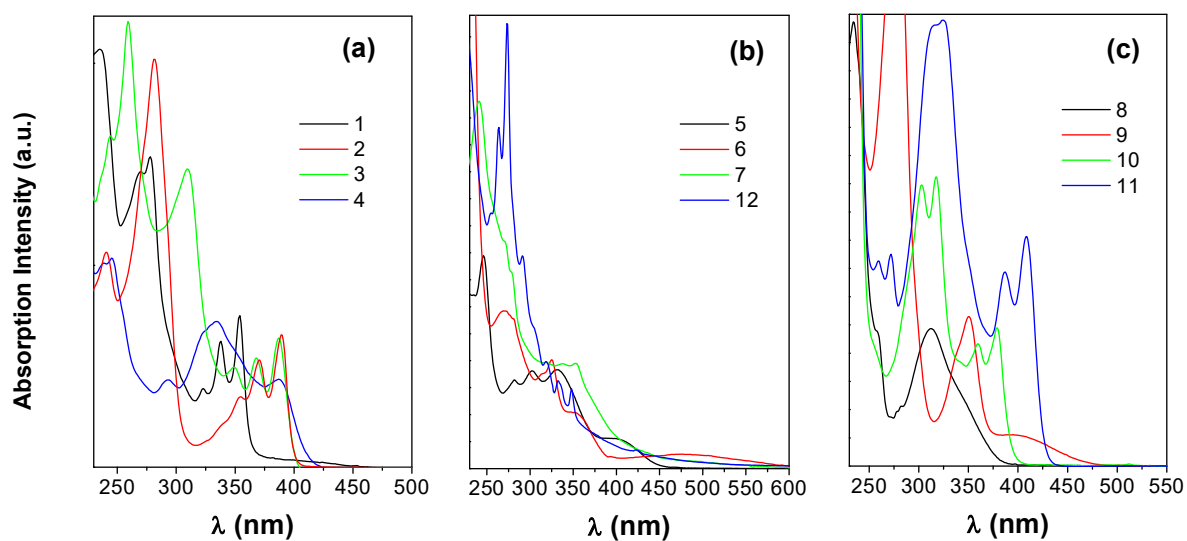


Figura 58. Espectros de absorción para ligandos con núcleo de quinolinio (a), azaquinolinio (b) y azoloquinio (c) en metanol a 25°C

Una vez obtenidos los espectros de absorción, se procedió a obtener los espectros de emisión de los cationes seleccionados, de nuevo disueltos en metanol. Estos espectros presentaron una única banda cuando el ligando en cuestión se excitó en el máximo de absorción de la banda de menor energía, es decir, a la longitud de onda del máximo de la banda más desplazada hacia el rojo (figura 59).

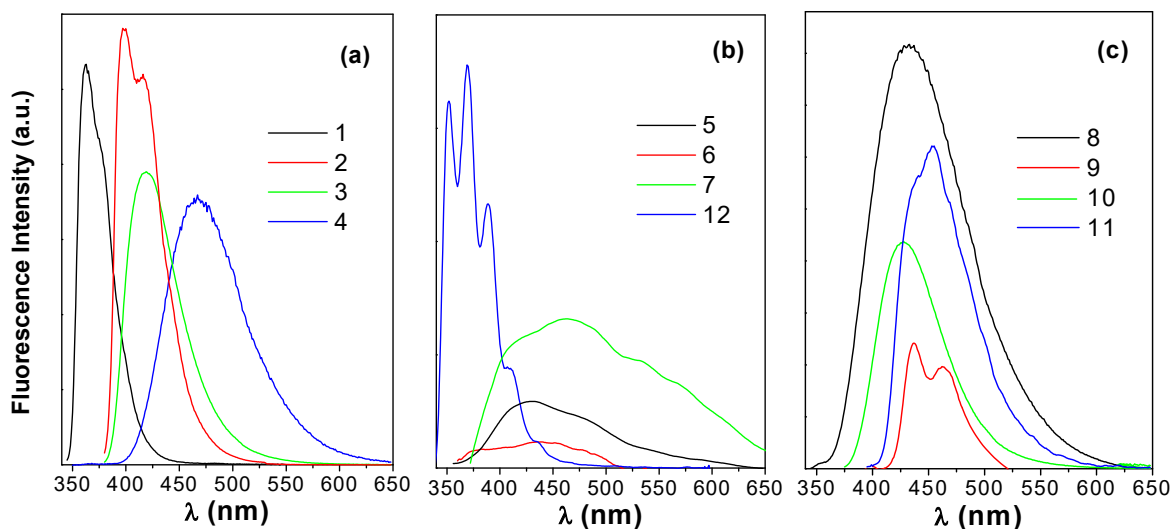
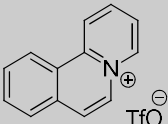
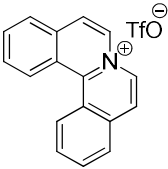
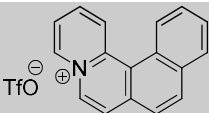
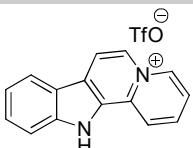
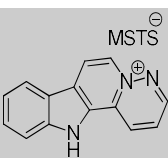
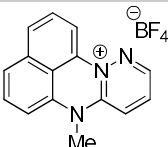


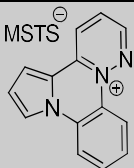
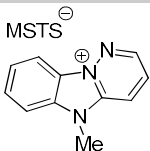
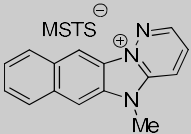
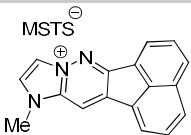
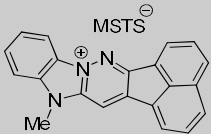
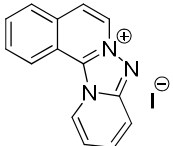
Figura 59. Espectro de emisión para ligandos con núcleo de quinolinio (a), azaquinolinio (b) y azoloquinio (c) en metanol a 25°C

Para completar la caracterización fotofísica de los ligandos, se obtuvieron otros parámetros de interés tales como la absorptividad molar (ϵ), el tiempo de vida media de fluorescencia (τ) y el rendimiento cuántico (ϕ), empleando los procedimientos que se encuentran descritos en el apartado de Materiales y Métodos. Las mediciones de los rendimientos cuánticos de fluorescencia, que difieren bastante entre los distintos compuestos, se llevaron a cabo en metanol. Los perfiles de decaimiento para los tiempos de vida media de fluorescencia encajan en ecuaciones bi- y monoexponenciales dependiendo de la naturaleza del sistema. Todos estos parámetros se encuentran descritos en la tabla 4.

La caracterización fotofísica de la serie de compuestos estudiados permitió identificar aquellos que presentaban una mayor eficiencia cuántica y, por tanto, una mayor intensidad en su fluorescencia. El conjunto de resultados obtenidos se ha recogido en la tabla 4. A continuación también se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de desnaturalización térmica de ADN.

Tabla 4. Afinidades de unión al ADN y selectividad de secuencia. Parámetros fotofísicos: Absortividades molares (ϵ , $M^{-1}cm^{-1}$) a la longitud de onda de excitación medidos en el estado estacionario ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm), longitud de onda de emisión (λ_{em} , nm), rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_f), usando una solución de quinina en ácido sulfúrico 0,1 M como estándar²⁵¹, y tiempos de vida media de fluorescencia (τ o $\langle\tau\rangle$, ns) monitorizados a las longitudes de onda de excitación/emisión de 335 nm/ λ_{em} para los ligandos **1-12** en metanol a 25°C

Estructura	Unión a ADN	Preferencia relativa GC/AT	ϵ ($\lambda_{m\acute{a}x}$)	λ_{em}	ϕ_f	τ_{ex} ($\langle\tau\rangle$)(ns)
1 	No	---	3180 (338)	361	0,23	3,6
2 	Baja	AT	10430 (371)	400	0,35	5,9
3 	Baja	AT	8240 (369)	419	0,15	5,0
4 	Si	AT	5600 (334)	467	0,15	11,8 ^a
5 	Baja	AT	11480 (331)	424	0,03	13,9
6 	Muy baja	No	9400 (325)	435	<0,01	4,7 ^a

	Estructura	Unión a ADN	Preferencia relativa GC/AT	ϵ ($\lambda_{\text{máx}}$)	λ_{em}	Φ_f	$\tau_{\text{ex}}(<\tau>)(\text{ns})$
7		No	---	14700 (354)	472	0,02	5,3 ^a
8		No	---	7210 (312)	442	0,33	16,7
9		No	---	12100 (351)	437	<0,01	3,6 ^a
10		Si	AT	13453 (360)	427	0,41	7,45
11		Si	AT	11850 (387)	450	0,25	4,4
12		No	---	7380 (320)	353	0,18	6,3

^a Medias ponderadas de los tiempos de vida media usando la ecuación 5 para aquellos compuestos cuyos perfiles de intensidad de fluorescencia se ajustan a funciones biexponenciales de decaimiento

De los datos obtenidos se pudo extraer como conclusión que la unión al ADN por parte de los cromóforos se encontraba estrechamente relacionada con el tamaño de estos. Así, los

compuestos penta y hexacíclicos presentan buenas propiedades de unión al ADN mientras que los compuestos tricíclicos no tienen afinidad por esta biomolécula. En lo que respecta a los cationes tetracíclicos, no se observa una tendencia clara ya que unos muestran afinidad por el ADN y otros no. Estos datos son consistentes con los obtenidos previamente en el grupo, donde ya se había observado que, en este tipo de sistemas, al menos 4 anillos fusionados son necesarios para producir una unión con el ADN.¹⁷⁴

Como se ha mencionado anteriormente, también se pretendía evaluar el papel de la distribución de la carga en el cromóforo. Para ello se prepararon los compuestos **2** y **3**, pero de la comparación de los datos obtenidos para estos compuestos, no se observaron diferencias significativas en la afinidad con la que ambos se unen al ADN, ni en su preferencia por hebras ricas en AT o GC. Tampoco se observa una tendencia clara en relación con la forma del cromóforo en el proceso de intercalación. Así, al comparar los ligandos tetracíclicos **4**, **6**, **7** y **12**, **7** y **12** no son capaces de intercalar en el ADN mientras que **4** y **6** sí presentan este tipo de unión. Aunque se admite que la no linealidad del cromóforo le confiere, en general, mejores propiedades intercalantes, en la comparación realizada entre los cuatro cromóforos seleccionados no está claro el papel que podría jugar la forma del ligando en relación con sus propiedades intercalantes. Posiblemente se necesitaría evaluar y comparar un mayor número de ligandos con formas menos dispares para demostrar (o no) algún tipo de tendencia preferente en relación con la forma del cromóforo.

De las doce estructuras seleccionadas, los derivados **4**, **10** y **11** (Figura 60) mostraron la mayor afinidad por la molécula de ADN y, de estos tres ligandos, los compuestos **4** (Figura 55)⁶² y **11** (Figura 57) sugieren una posible preferencia de estos cromóforos por secuencias de ADN ricas en AT. Por esta razón estos dos compuestos fueron seleccionados para un estudio más detallado de su unión al ADN. En este estudio se perseguía determinar experimentalmente las constantes de afinidad y la orientación de los ligandos en el proceso de intercalación por métodos fotofísicos, así como obtener estos mismos datos mediante métodos computacionales. Para probar la validez de los métodos y a efectos comparativos, en este estudio también se incluyó el compuesto **8**, el cual presenta una buena señal de fluorescencia pero no presenta afinidad por ADN.

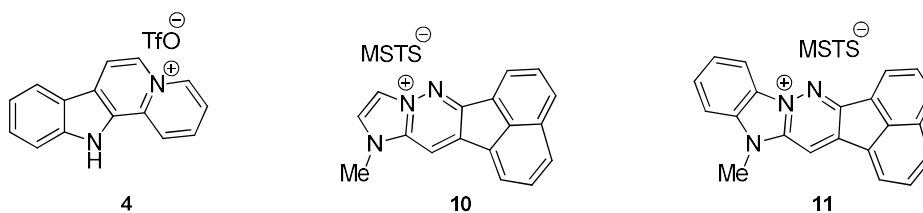


Figura 60. Sistemas seleccionados en base a su unión a ADN y perfil fotofísico.

3.2. Cationes derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio

Para estudiar las características en la absorción UV-Vis de esta serie, los compuestos analizados se han agrupado teniendo en cuenta el número de ciclos fusionados (Figura 61). En el grupo formado por los compuestos que presentan 6 ciclos fusionados, se puede observar que el compuesto **13** sin sustituir tiene la banda de menor energía a 386 nm con un hombro a 445 nm. Los compuestos arilados presentan sus bandas a longitudes de onda mayores. Así, los cromóforos **23**, **31** y **32**, que se encuentran monosustituídos, presentan transiciones en absorción a 392 nm muy cercanas a la del compuesto **13**. Sin embargo, se aprecia la presencia de hombros o incluso una banda en el caso del compuesto **32** a longitudes de onda mayores, lo cual es razonable al ser compuestos con mayor conjugación que el ligando **13**. Cabe resaltar también que el efecto donador de los sustituyentes ($\text{Br} < \text{C}_6\text{H}_5 < \text{MeOC}_6\text{H}_4$) produce un efecto batocrómico en la banda menos energética. Los espectros de absorción de los cationes disustituídos **26**, **33** y **34** presentan características similares con los máximos de las bandas de menor energía a 396, 431 y 422 nm respectivamente. Sin embargo, como ya sucede en el caso de los cationes monosustituídos, estas bandas poseen hombros, los cuales se encuentran desplazados hacia longitudes de onda mayores a medida que aumenta el carácter donador del sustituyente.

En el grupo de los compuestos pentacíclicos se observa que el compuesto no sustituido **14** presenta una banda de absorción a 369 nm, mientras que, como era de esperar los compuestos **25**, **35** y **36** con mayor conjugación presentan bandas a longitudes de onda mayores. También se observa el mismo efecto que en los compuestos de seis ciclos, los sustituyentes con mayor carácter donador desplazan la longitud de onda de la banda de menor energía a mayor longitud de onda. En ninguno de estos compuestos se observan hombros como en el caso del grupo de los ligandos hexacíclicos, lo cual puede ser atribuible al ciclo extra de estos últimos.

Los compuestos tricíclicos presentan los máximos en la banda de menor energía a longitudes de onda menores que las observadas para el resto de compuestos. El compuesto **37**, sustituido con dos grupos fenilo presenta una banda de absorción a 345 nm, sin embargo, los compuestos trisustituidos presentan los máximos de absorción a longitudes de onda mayores y se observa en el compuesto **39** la presencia de un hombro hacia longitudes de onda de menor energía atribuible al resto metoxilo. Cabe destacar el efecto batocrómico debido al carácter donador de los sustituyentes fenilo (**38**) y, más aún en el caso del metoxifenilo con un hombro a 400 nm (**39**).

Después de obtener los espectros de absorción, usando el máximo de menor energía como longitud de onda de excitación, se procedió a obtener los espectros de emisión de los compuestos de esta familia disueltos en una mezcla DMSO/H₂O al 5% a bajas concentraciones (10⁻⁵ mol/L). Los espectros fueron realizados en este medio acuoso para simular las mismas condiciones que se utilizarían en las pruebas biológicas y a fin de alterar lo menos posible la estructura del ADN a utilizar en estudios posteriores. Todos los espectros de emisión presentaron una única banda, con excepción del compuesto disustituido **34** que presenta dos bandas, en la zona del espectro desde 450 nm a 600 nm. Esta característica los hace *a priori* mejores candidatos para tinción de estructuras celulares en modelos de células vivas ya que la emisión y, por tanto, la excitación tiene lugar en una región menos energética del espectro que la exhibida por los compuestos estudiados en el capítulo anterior, con menor daño, por tanto, para las células.

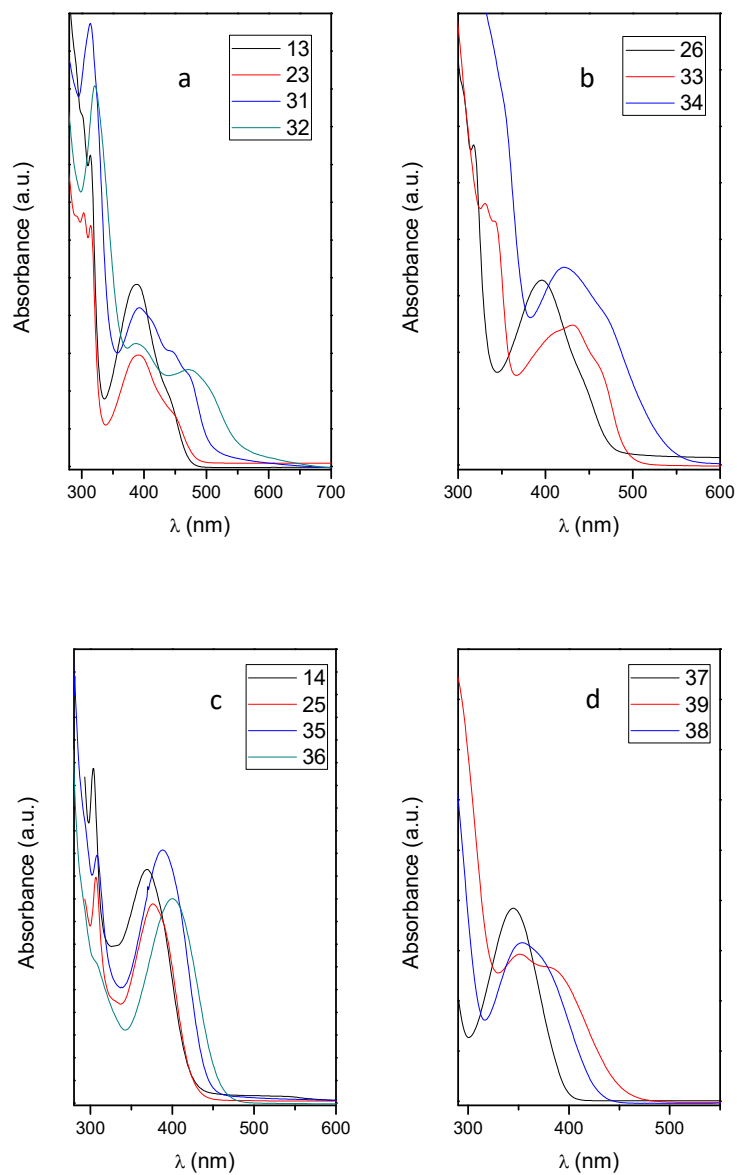


Figura 61. Espectros de absorción: Hexacíclicos monosustituídos (a), Hexacíclicos disustituídos (b) pentacíclicos (c) y tricíclicos (d) obtenidos a 25°C en DMSO/agua al 5%.

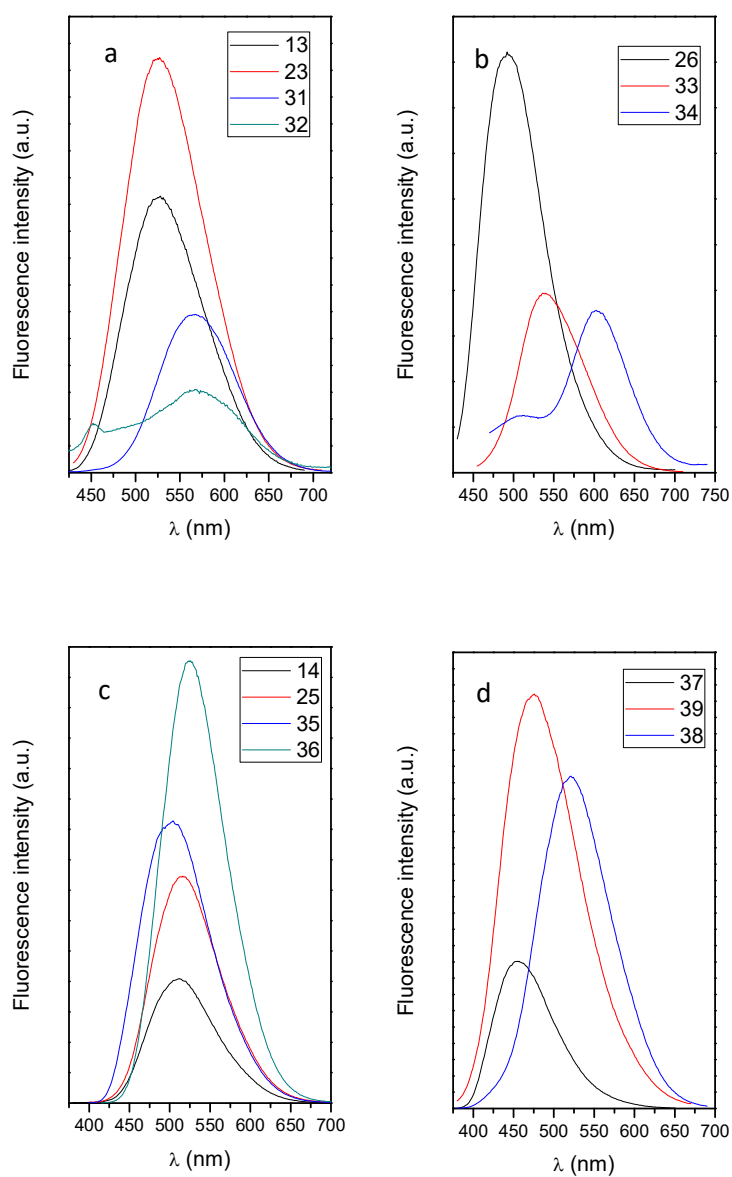
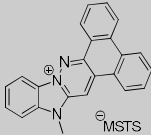
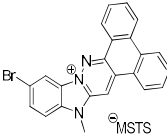
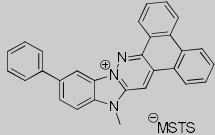
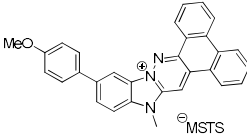
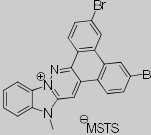
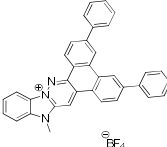


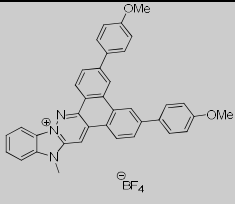
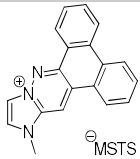
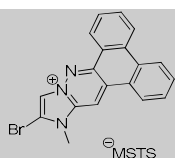
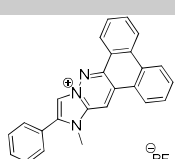
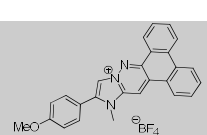
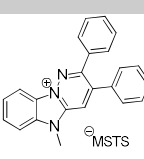
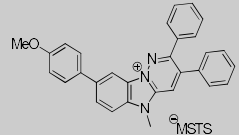
Figura 62. Espectros de emisión: Hexacíclicos monosustituídos (a), Hexacíclicos disustituídos (b) pentacíclicos (c) y tricíclicos (d) obtenidos a 25°C en DMSO/H₂O al 5%.

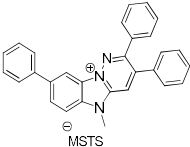
En la figura 62, se detallan los espectros de emisión de los cromóforos de esta serie. El efecto batocrómico de la mayor conjugación y el mayor carácter donador del sustituyente sobre el espectro de emisión no es tan claro como lo era en el espectro de absorción. La emisión es un fenómeno más complejo que la excitación. Los ligandos **23**, **31** y **32** (6 ciclos fusionados) presentan sus máximos de emisión a 525, 555 y 562 nm respectivamente en orden creciente al carácter donador del sustituyente. Algo parecido sucede con los espectros de emisión de los cationes disustituídos **26**, **33** y **34** que presentan sus máximos a 498, 541 y 598 nm respectivamente. En el caso de los ligandos pentacíclicos (**25**, **35** y **36**), así como en los compuestos **37**, **38** y **39**, el efecto no es tan patente.

La caracterización fotofísica se completó con la determinación de la absorptividad molar (ϵ) y la eficiencia o rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ) (tabla 5). Cabe destacar la baja intensidad de fluorescencia observada en muchos de los compuestos (**23**, **25**, **26**, **31**, **32**, **33**, **34** y **39**) cuyos rendimientos cuánticos de fluorescencia son $\leq 5\%$. Tan solo tres de los compuestos estudiados (**35**, **36**, **37** y **38**) presentan una intensidad de fluorescencia superior, siendo el compuesto **37** el que presenta el mayor valor (34%). Estas bajas intensidades de fluorescencia intrínseca en estos compuestos los convierten *a priori*, en buenos candidatos para ser sondas de tipo *light-up*, dado que se podría esperar un aumento de la misma cuando estos compuestos se encuentren intercalados entre los pares de base de ADN.

Tabla 5. Parámetros fotofísicos: Absortividades molares (ϵ , $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a la longitud de onda de excitación medidos en el estado estacionario (λ_{max} , nm), longitud de onda de emisión (λ_{em} , nm), rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f)

		λ_{abs}	$\epsilon (\lambda_{\text{máx}})$	λ_{em}	Φ_f
13		386 , 445(h) 320, 275	10,81 (386)	532	0,04
23		392 , 450(h), 314, 303, 272	9,29 (392)	525	0,01
31		392 , 472(h) 445 (h), 313, 280 (h)	13,28 (392)	555	0,05
32		392 , 480, 321	6,04 (392)	562	0,01
26		396 , 440 (h) 325, 312 (h), 280	10,84 (396)	498	0,003
33		431 , 470 (h) 345 (h), 330, 292	10,83 (431)	541	0,034

34		422, 474 (h) 350 (h), 320 (h) 267	3,91 (422)	598	0,0008
14		369, 305	7,34 (369)	511	0,11
25		378, 305	5,95 (378)	513	0,04
35		388, 305, 270 (h)	38,39 (388)	504	0,17
36		402, 305 (h), 275	17,85 (402)	525	0,24
37		345, 264	11,51 (345)	457	0,34
39		352, 400 (h), 280 (h), 270	11,04 (352)	470	0,007

38		354, 250	17,08 (354)	520	0,134
-----------	---	-----------------	------------------------	------------	--------------

3.3. Cationes derivados de piridoimidazopyridazinio

3.3.1. Derivados de piridoimidazopyridazinio no sustituidos

El primer paso en la caracterización fotofísica de los cromóforos **40** y **41** fue la obtención tanto de sus máximos de absorción como de sus absorptividades molares. Para ello, se midieron sus espectros de absorción empleando como disolvente DMSO/H₂O al 5% y MeOH siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de Materiales y métodos (figura 63).

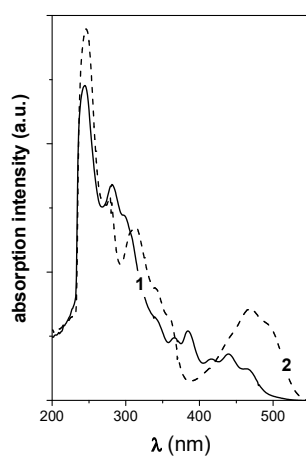


Figura 63. Espectros de absorción para los compuestos **40** (---) y **41** en DMSO/agua al 5% a 25°C

Una vez conocidos los máximos de absorción de estos cromóforos, se procedió a la obtención de sus espectros de emisión a concentraciones del orden de 10⁻⁵ mol/L usando como longitud

de onda de excitación 440 para el ligando **41** y 470 nm para el ligando **40** (figura 64). De esta manera, se observó que, mientras el espectro de emisión del compuesto **41** tiene una banda a aproximadamente 515 nm que viene acompañada de un hombro a 488 nm, sólo se observa una banda a aproximadamente 538 nm en el caso del derivado **40**. Para ambos compuestos, disueltos en DMSO/H₂O 5% y MeOH a 25°C, los rendimientos cuánticos de fluorescencia fueron calculados usando como estándar de fluorescencia Cumarina 153 en etanol.²⁵¹

En la tabla 6 se muestran resumidos los parámetros obtenidos en la caracterización fotofísica de estos compuestos. Cabe resaltar los valores obtenidos en las eficiencias cuánticas cuando se comparan con los obtenidos en las series anteriores, especialmente el del compuesto **40** con un valor de 0,32. Otro dato reseñable es la longitud de onda poco energética a la cual emiten, lo cual es una característica de interés para aplicaciones en tinción celular.

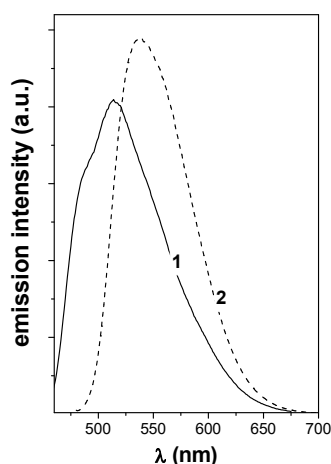
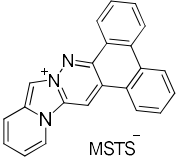
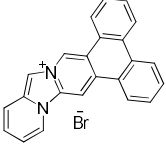


Figura 64. Espectros de emisión de los compuestos **40** (---) y **41**

Tabla 6. Parámetros fotofísicos de los cromóforos **40** y **41** obtenidos en DMSO/agua al 5% y en (metanol) a 25°C

Ligando	Estructura	Espectro de Absorción (picos y hombros), λ_{ex}	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) en 5% DMSO/agua a λ_{ex} (en metanol a 458 nm)	ϕ_f a λ_{ex} (en metanol)	$\lambda_{em, max}$ (nm)
---------	------------	---	---	--	--------------------------

40	 MSTs ⁻	246(p),279(s),314(p) 340(s),358(s),441(s), 470 (p),485(s)470	8940 (5,570)	0,32 (0,46)	536
41	 Br ⁻	244(p),280(p),299(s) 340(s),365(p),385(p) 416(s), 440 (p),463(s)	2580 (3,440)	0,17 (0,16)	528

3.3.2. Cromóforos basados en piridoimidazocinolinio sustituido.

En la figura 65 se muestran los espectros de absorción de los compuestos **50**, **52-57**, para las disoluciones a baja concentración de los ligandos descritos en este capítulo en una mezcla de agua y DMSO al 5% a 25°C.

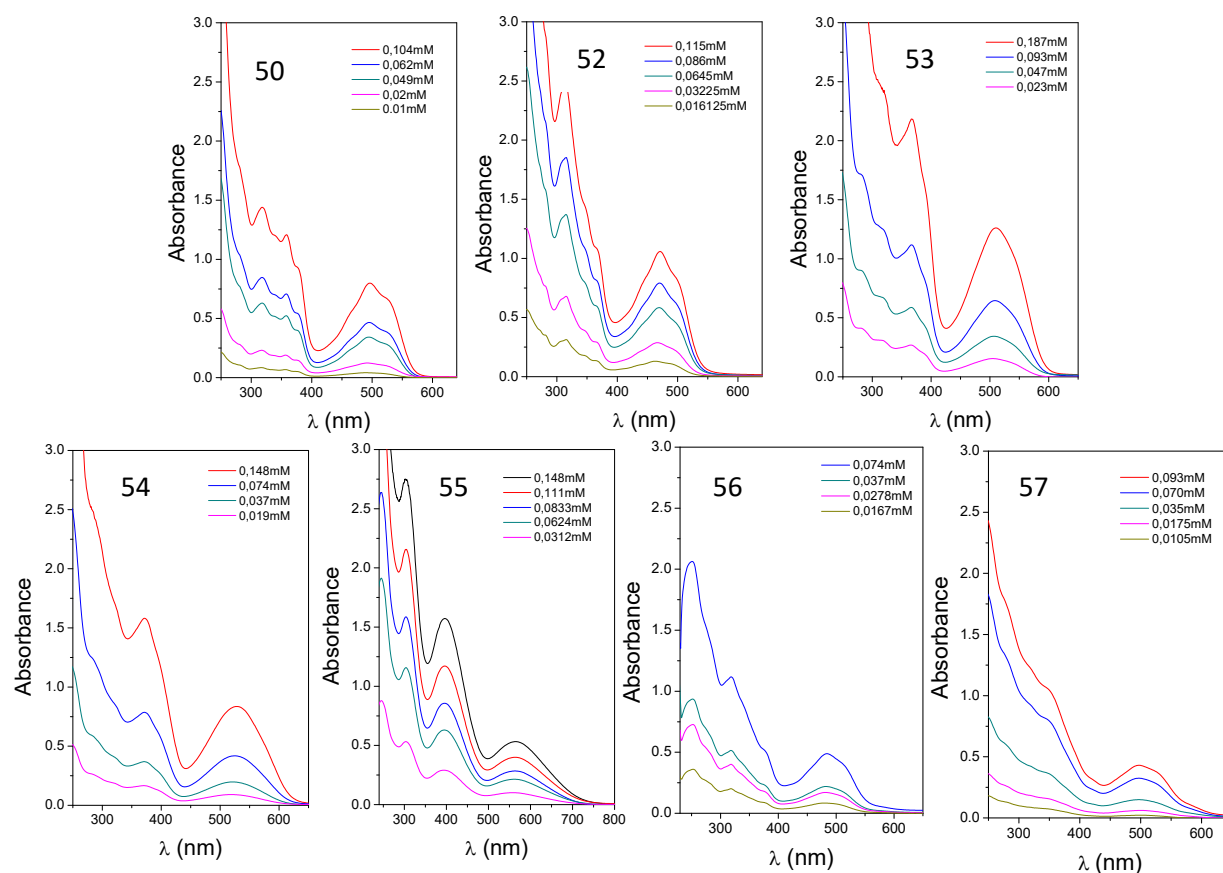


Figura 65. Espectros de absorción para los compuestos **50**, **52**, **53**, **54**, **55**, **56** y **57** en una mezcla de agua/DMSO al 5% a 25°C a distintas concentraciones

Los espectros de emisión se obtuvieron posteriormente y se muestran en la Figura 66. Se obtuvieron excitando la muestra a la longitud de onda del máximo de absorción de la banda de menor energía a concentraciones del orden de 10^{-5} mol/L. De los espectros de emisión se obtuvo el máximo de emisión y la eficiencia cuántica del compuesto, usando Rodamina 101 o Cumarina 153 en MeOH o EtOH respectivamente como estándares.²⁵¹ Finalmente, también se obtuvo el tiempo de vida media de fluorescencia.

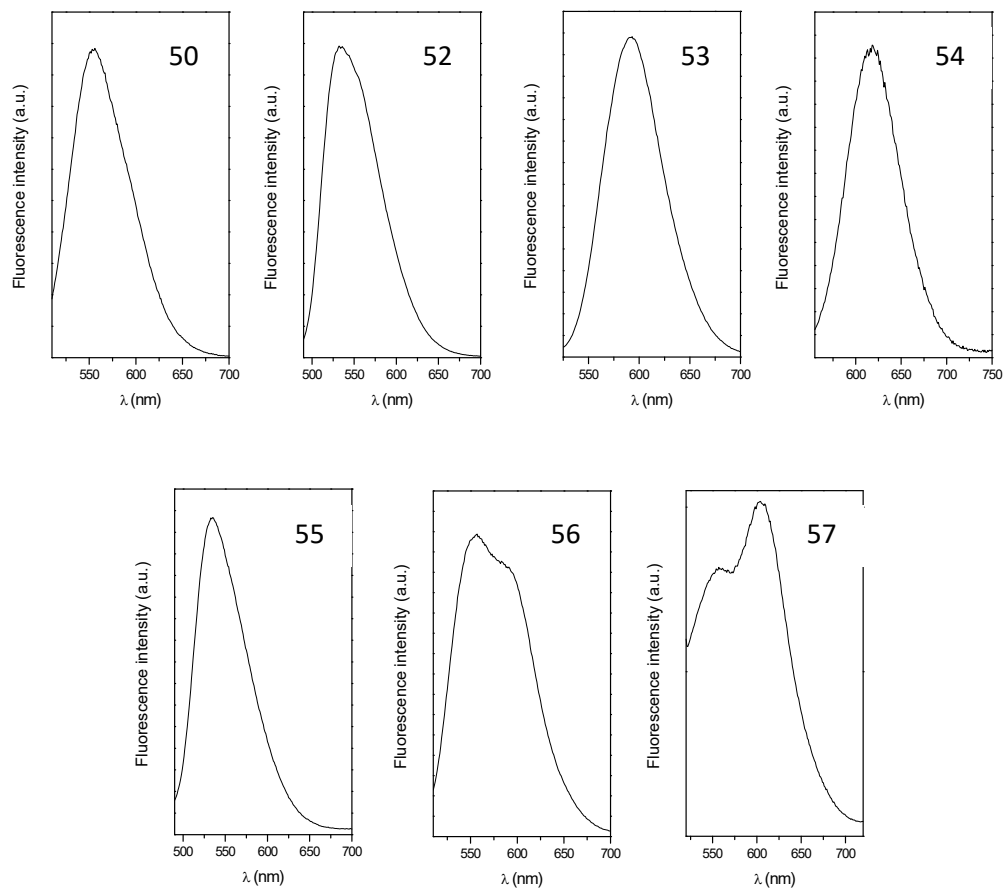


Figura 66. Espectros de emisión para los compuestos **50**, **52**, **53**, **54**, **55**, **56** y **57** en una mezcla de agua/DMSO al 5% a 25°C

Los datos obtenidos para los compuestos estudiados se muestran en la tabla 7 y muestran, como se presumía, rendimientos cuánticos bajos. Sin embargo, presentan máximos de emisión a longitudes de onda poco energéticas, característica muy deseable al tratarse de compuestos orientados a emplearse en células vivas.

Tabla 7. Datos fotofísicos para los ligandos en agua/DMSO al 5% a 25 °C. (p) y (h) significan pico y hombro respectivamente. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_f) fueron obtenidos usando Rodamina 101 (*) o Cumarina 153 (**)²⁵¹

Compuesto	λ_{\max} (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) at λ_{\max}	$\lambda_{em, \max}$ (nm)	ϕ_f (a $\lambda_{em, \max}$)	$\langle \tau \rangle$ (ns)
50	277(h),318(p),339(h), 358(p),377(h),460(h), 497 (p), 526(h)	8204	548(p)/574(p)	$9,8 \times 10^{-3}$ (*)	3,7
52	249(p),280(h),305(h), 315(p),345(h),366(h), 441(h), 471 (p),500(h)	9217	533(p)/556(h)	0,03 (**)	2,3
53	321(h),367(p),387(h), 512 (p),540(h)	6418	587(p)	0,04 (*)	5,4
54	246(p),285(h),322(h) 372(p),394(h), 532 (p)	5358	621(p)	$2,7 \times 10^{-3}$ (*)	1,2
55	244(p),302(p), 396 (p),566(p)	1102	534(p)	$1,1 \times 10^{-3}$ (*)	Muy bajo
56	250(p),272(h),318(p), 378(h), 488 (p),515(h)	6970	552(p)/593(h)	0,11 (**)	7,5
57	246(p),275(h),313(h), 349(h), 497 (p),530(h)	4920	555(h)/604(p)	$2,26 \times 10^{-3}$ (*)	3,4

4. Estudios de unión con ADN de timo bovino

Una vez obtenida la caracterización fotofísica de los compuestos sintetizados en este trabajo, se procedió a estudiar, en profundidad, su comportamiento en presencia de ADN de timo bovino. Para este fin se utilizaron las valoraciones de fluorescencia, tiempo de vida media de

fluorescencia en presencia de ADN y estudios de dicroísmo circular lo que aporta información sobre el modo de unión, la afinidad del ligando por el ADN y las orientaciones que puede tener el cromóforo dentro del bolsillo de unión de esta macromolécula.

Los compuestos a estudiar se han agrupado de manera análoga a como se viene realizando hasta el momento.

- Cationes seleccionados de la quimioteca (**4**, **8** y **11**)
- Cationes derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio
- Cationes derivados de piridoimidazopiridazinio

4.1. Cationes heteroaromáticos tipo azonia 4, 8 y 11.

4.1.1. Valoración de fluorescencia con ADN de timo bovino

Con la intención de estudiar la unión de los cromóforos **4**, **8** y **11**, se realizó una valoración de fluorescencia de los mismos usando ADN de timo bovino a una concentración conocida. Los espectros de emisión de los cromóforos **4**, **8** y **11** disueltos en PBS (pH = 7,4) fueron recogidos a 25°C tras la adición de cada alícuota de ADN como se muestra en la figura 67. El objetivo de estas valoraciones era hallar las constantes de afinidad de estos ligandos por el ADN. El procedimiento se encuentra reflejado en el apartado de Materiales y Métodos de este trabajo. Las longitudes de onda de excitación fueron fijadas a 334, 310 y 387 nm para los compuestos **4**, **8** y **11** respectivamente, siendo estas los máximos de absorción en la banda menos energética para cada uno de ellos.

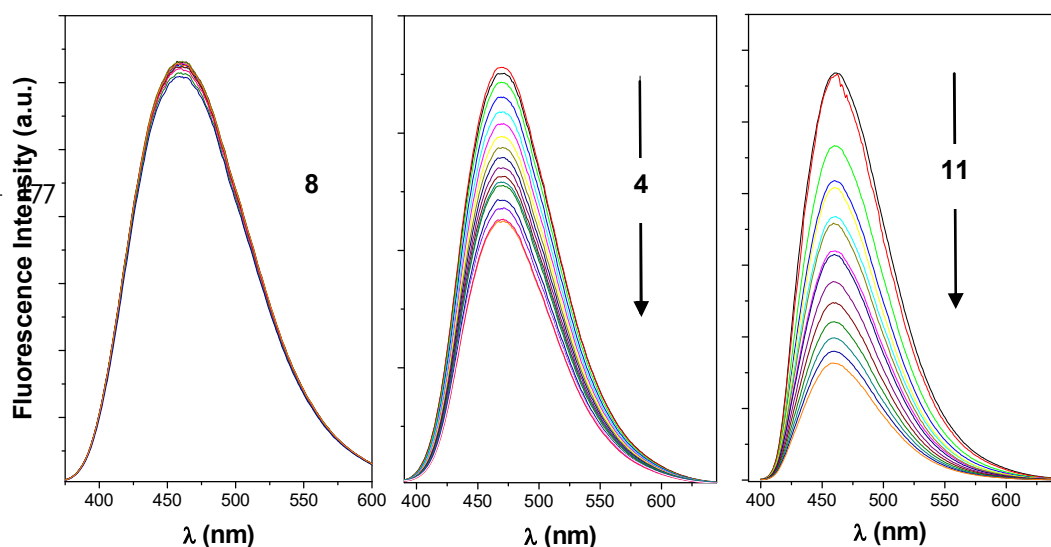


Figura 67. Espectros de emisión para las disoluciones de los ligandos **8**, **4** y **11** ($[L] = 1.9, 1.9$ y 1.94×10^{-5} mol/L, respectivamente) y tras la adición de alícuotas de ADN en una valoración a 25°C

Los espectros de emisión en ausencia y en presencia de ADN de timo bovino mostraron las mismas características que aquellos que fueron obtenidos en metanol durante la caracterización fotofísica realizada previamente. Una de las características comunes para los compuestos **4**, **8** y **11** fue una única banda centrada en torno a 470, 460 y 460 nm, respectivamente. Estas bandas no sufrieron un desplazamiento significativo tras la adición de ADN de timo bovino, sin embargo, sí se observaron cambios en las intensidades de fluorescencia al aumentar la concentración de esta biomolécula. En concreto, se observó una disminución para los compuestos **4** y **11**, mientras que la intensidad de fluorescencia de **8** apenas varió. Este hecho es debido a una reacción de transferencia de electrones fotoinducida^{3, 99} entre los cromóforos y los pares de base del ADN entre los que se intercalan. Por este mismo motivo no se aprecia desactivación en el caso del ligando **8** pues, como ya se había observado en los ensayos de desnaturalización, este cromóforo no es capaz de intercalar la doble hebra de ADN y por tanto la reacción de transferencia de electrones fotoinducida no tiene lugar. La variación en la intensidad de fluorescencia normalizada se muestra en la figura 68 observándose la forma característica de las gráficas de asociación: al llegar a una concentración determinada de ADN, la cual difiere para cada ligando, la curva ascendente alcanza una meseta, lo que indica que se han saturado los sitios de unión de la molécula de ADN.

La variación en la anisotropía (r) también se muestra en la figura 68. Los valores de r y sus signos denotan diferentes orientaciones en los momentos de transición de absorción y

emisión, tamaños moleculares y difusión rotacional en un disolvente de baja viscosidad (PBS). Los cambios observados en r tras la adición de alícuotas de ADN fueron diferentes dependiendo del ligando. Los valores de r para **4** y **11** aumentaron significativamente con el aumento de la concentración de ADN. Sin embargo, apenas se observa un aumento en el valor de r para el compuesto **8**. Este aumento de r es típico de la formación de un complejo ligando:ADN cuyo tiempo de relajación rotacional es mayor que el del ligando libre, por lo que el aumento en los valores de r indica que se está produciendo una asociación entre las moléculas de ligando y ADN, lo que confirma lo observado en las valoraciones de fluorescencia para los compuestos **4** y **11**. Por el contrario, en un ligando que no es capaz de interactuar con el ADN como es el compuesto **8**, no se observa una variación significativa en su anisotropía de fluorescencia (r).

Las intensidades de fluorescencia normalizadas fueron utilizadas en las curvas mostradas en la figura 68 para los compuestos **4** y **11**. Estas curvas se obtuvieron al ajustar los datos experimentales a la ecuación 3 (Materiales y métodos) y presentaron un buen ajuste, dando lugar a valores para las constantes de unión de $(2,8 \pm 1,3) \times 10^4$ y $(6,9 \pm 2,6) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. Estos valores tienen el mismo orden de magnitud que aquellos publicados previamente para ligandos tipo *azonia* de parecido tamaño, como los nafto- e indoloquinolizinio.³ La determinación del número medio de pares de bases nucleicas por ligando unido (**4** y **11**) dio unos valores de $8,0 \pm 0,4$ y $5,9 \pm 0,3$ respectivamente. Sin embargo, y como era de esperar, el compuesto **8** no interacciona con el ADN. Las curvas mostradas en la figura 68 (derecha) para los cambios en la anisotropía de los compuestos **4** y $\mathbf{11}$ se obtuvieron ajustando los datos experimentales a una ecuación similar, la ecuación 2 (Materiales y métodos) usando r en lugar de la intensidad de fluorescencia. Los valores de I , K y n se obtuvieron de las medidas de intensidad de fluorescencia.

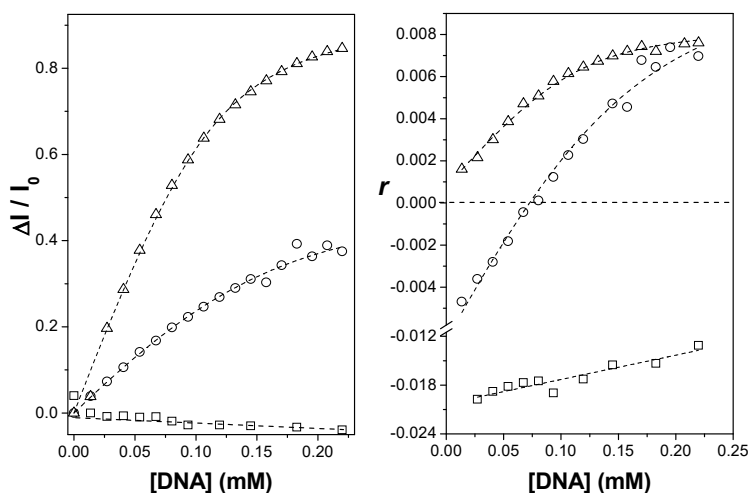


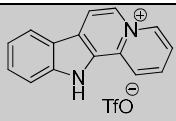
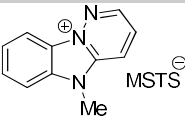
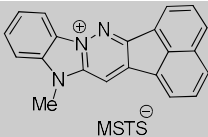
Figura 68. (Izquierda) Variación normalizada de la intensidad de fluorescencia para disoluciones tampón (PBS con un 5% en DMSO) de los ligandos **8**, **4** y **11** ([Ligando] = 1.9, 1.9 y 1.94 × 10⁻⁵ mol/L respectivamente, a esta concentración no se observó precipitación del complejo durante la valoración) a 25°C versus [ADN]. (Derecha) Anisotropía de fluorescencia versus [ADN] para las mismas disoluciones a 25°C. Los símbolos corresponden a **4** (○), **8** (□) y **11** (△). Los valores de *r* fueron monitorizados en el máximo de emisión tras excitar a 334, 310 y 387 nm, respectivamente

4.1.2. Tiempos de vida media en presencia de ADN de timo bovino

El tiempo de vida media de fluorescencia de un ligando es el tiempo que permanece este en el estado excitado. Esta medida proporciona información sobre los procesos que ocurren en el ligando mientras se encuentra en el estado excitado. En el espectrofluorímetro de resolución temporal se obtienen perfiles de decaimiento de fluorescencia los cuales fueron ajustados a funciones de decaimiento multiexponencial. El ajuste a esta función arroja unos parámetros que al ser introducidos en la ecuación 5 del apartado Materiales y métodos proporcionan el tiempo de vida media de fluorescencia en nanosegundos.

Los perfiles de decaimiento de fluorescencia para los ligandos **4**, **8** y **11** parecen no ser particularmente sensibles a la presencia de ADN de timo bovino. Los tiempos de vida media presentados en la tabla 8 fueron más o menos parecidos para todos los ligandos en presencia o ausencia de ADN. No obstante, mientras que los perfiles de decaimiento para los compuestos **8** y **11** se ajustaron a una función monoexponencial de decaimiento, para el compuesto **4** se ajustaron a una función biexponencial con componentes de aproximadamente 4,5 ns y 15 ns. Los valores de τ apenas sufrieron cambios tras la adición de ADN de timo bovino. Este hecho se puede atribuir también a una reacción de transferencia de electrones fotoinducida rápida donde las bases de ADN se encuentran involucradas, lo cual, probablemente, disminuiría los tiempos de vida media del ligando unido en valores inferiores al límite de detección de nanosegundos que tiene el instrumento.^{252, 176, 253, 254}

Tabla 8. Componentes de las vidas medias, contribuciones y medias ponderadas para el intercalante en disolución acuosa en ausencia y presencia de ADN de timo bovino (entre paréntesis) a 25°C. La concentración de ADN fue la mayor utilizada en los experimentos previos. Un nanoled emitiendo a 335 nm se usó como fuente de excitación

		λ_{em} (nm)	τ_1 (ns)	%	τ_2 (ns)	%	$\langle\tau\rangle$ (ns)
4		465	4,3 (4,5)	54,2 (39,6)	14,8 (15,0)	45,8 (60,4)	9,1 (10,9)
8		442	4,1 (4,2)	100	---	---	---
11		460	4,3 (4,3)	100	---	---	---

4.1.3. Dicroísmo circular

La interacción de los compuestos **4**, **8** y **11** con ADN se estudió también mediante espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Los espectros de CD en la región en la cual el ADN es capaz de absorber dan información sobre los cambios en la estructura secundaria del ADN causada por las interacciones con el ligando.²⁵⁵ Como se observa en la figura 69 para el compuesto **11**, una vez este interacciona con el ADN de timo bovino, la biomacromolécula muestra el típico espectro de CD para la forma B del ADN con efecto Cotton positivo y negativo centrados en ≈ 278 y ≈ 245 nm. Estas dos bandas, debidas al apilamiento y la helicidad hacia la derecha de la cadena de nucleótidos respectivamente, son susceptibles de cambios debidos al modo de interacción con moléculas pequeñas.²⁵⁶⁻²⁵⁹ Mientras que la unión al surco del ADN de moléculas pequeñas, en muchos casos, no muestra o muestra una perturbación muy pequeña en las bandas de apilamiento y helicidad, los intercalantes, por lo general, aumentan la intensidad en ambas bandas. Estos cambios en el espectro de CD del ADN son consecuencia del incremento en las interacciones entre los pares de bases y el ligando y también al desenrollamiento y alargamiento de la hélice de ADN tras la intercalación del ligando. Como se muestra en la figura 69, las intensidades de ambas bandas aumentan significativamente tras aumentar la concentración del compuesto **11**, lo que estaría probando que el modo de unión

de este compuesto con el ADN sería por intercalación. Cambios similares fueron también observados en el caso de **4**.

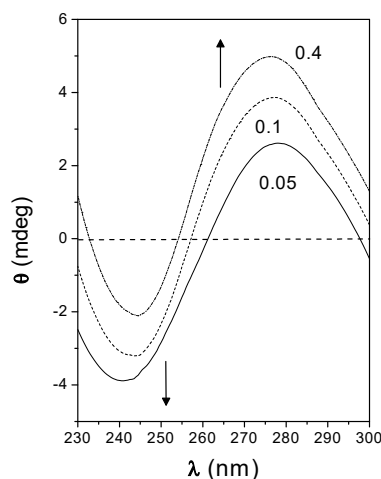


Figura 69. Espectro de CD (como elipticidad, θ) en la región donde absorbe el ADN a 25°C para disoluciones tampón (PBS con DMSO al 5%) del ligando **11** presencia de AND de timo bovino ($[DNA] = 3.57 \times 10^{-4} M$) a distintos ratios ligando/ADN

Los compuestos que no presentan quiralidad -como es el caso de **4**, **8** y **11**- muestran una señal igual a 0 a lo largo de todo el espectro de CD. Esta señal, sin embargo, puede ser inducida (ICD) en estos cromóforos como consecuencia de un posible acoplamiento no degenerativo de sus momentos de transición y la media de los momentos de transición de las bases del ADN. De esta manera, la observación de un espectro de ICD en la región en la cual absorbe el ligando es una prueba irrefutable de la interacción entre el cromóforo y el ADN, variando la intensidad y el signo de las señales de ICD según sea la posición y orientación relativa del cromóforo entre las bases del ADN. Un intercalante presenta una señal negativa débil cuando el momento de la transición para la correspondiente banda de absorción está orientada a lo largo del eje mayor del bolsillo de unión del ADN (paralelo al bisector de los pares de base). Sin embargo, se espera una señal de ICD positiva e intensa cuando el momento de la transición está polarizado perpendicularmente al eje mayor del bolsillo de unión. La señal de ICD para un ligando unido al surco es de uno o dos órdenes de magnitud mayor que para un compuesto que intercala ADN. Además, si el momento de la transición se encuentra orientado a lo largo del surco formando un ángulo de 45° con las bases se espera una señal de ICD positiva.^{256, 252, 260, 261}

Los espectros de ICD para los ligandos **4**, **8** y **11** en presencia de ADN, con un ratio molar fijo de Ligando:ADN de 0,4, se muestran en la figura 70 (izquierda). No se observó señal de ICD para el compuesto **8** a ningún ratio molar, dado que en dicho ligando no había interacciones entre el ligando y el ADN. Sin embargo, el espectro de ICD para los compuestos **4** y **11** mostraron dos regiones con efectos Cotton negativo y positivo a todos los ratios molares usados, cuyos rangos fueron $\approx 295\text{-}335\text{ nm}$ y $\approx 335\text{-}460\text{ nm}$ respectivamente (figura 70 derecha). Las señales de CD fueron mucho más débiles para el ligando **4** que para **11**. Estas bandas asimétricas inducidas negativas y positivas parecen correlacionarse con las bandas que aparecen en los espectros de absorción de estos compuestos, por lo que se asume que se deben a la absorción de luz polarizada por parte del ligando estudiado y no a la formación de un excitón debido a la agregación intermolecular de **4** y **11**, los cuales, como se aprecia en los experimentos llevados a cabo, se encuentran asociados con ADN.^{252, 260, 261}

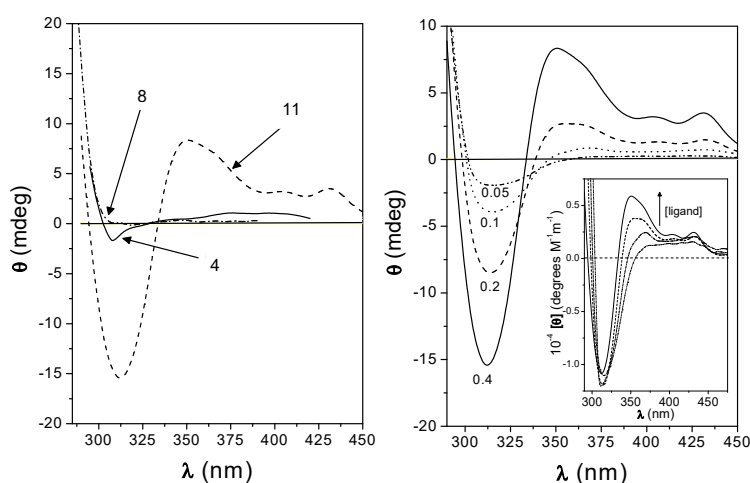


Figura 70. Izquierda. Espectro de CD (mostrado como elipticidad θ) para disoluciones de los compuestos **4**, **8** y **11** en tampón (PBS conteniendo un 5% de DMSO) en presencia de ADN de timo bovino ($[\text{DNA}] = 3.57 \times 10^{-4}\text{ M}$) a 0,4 de ratio molar (Ligando/ADN). Derecha. Disoluciones del ligando **11** a distintos ratios molares ligando/ADN

Por otro lado, la elipticidad molar muestra un incremento en la banda positiva cuando hay un aumento en la concentración de ligando, dicho incremento no tuvo lugar para la banda negativa, por lo tanto, en analogía a otros sistemas de quinolizinio,³ y asumiendo que los momentos de la transición que aparecen en las bandas a mayores longitudes de onda ($\approx 335\text{-}400\text{ nm}$) son casi paralelas al eje mayor del ligando; el signo de las bandas revela intercalación para el compuesto **4** y **11** con su eje molecular largo perpendicular al bolsillo de unión del ADN.^{3, 261} Consecuentemente la banda negativa ($\approx 295\text{-}335\text{ nm}$) es consistente con una banda

de absorción cuyo momento de transición está orientado a lo largo del eje molecular más corto. Los valores relativamente bajos para la elipticidad, los cuales son positivos, especialmente para **4**, también excluyen la posibilidad de unión al surco.

4.2. Cationes derivados de imidazopiridazinio y benzoimidazopiridazinio

4.2.1. Valoración de fluorescencia con ADN de timo bovino

Los espectros de emisión de estos cromóforos disueltos en DMSO/H₂O al 5% fueron realizados a 25°C tras la adición de alícuotas de ADN como se muestra en la figura 67. Las longitudes de onda de excitación fueron fijadas en el máximo de la banda de absorción de menor energía para estos compuestos.

Los espectros de emisión obtenidos para los cromóforos de esta familia en presencia de ADN presentan, por lo general, las mismas características que aquellos obtenidos en ausencia de ADN. Una característica común en todos los compuestos de la serie es la disminución en la intensidad de fluorescencia en presencia de ADN. La única excepción a esta tendencia se observa en el ligando **39** cuya nueva banda en presencia de ADN a 545 nm aumenta en intensidad al añadir alícuotas de ADN a la muestra creando un punto isobéptico entre las dos bandas, lo cual sugiere un equilibrio entre la especie unida con ADN y la especie libre.

Estos resultados no parecen corroborar nuestra hipótesis de partida de que la introducción en el cromóforo de sustituyentes con libertad de giro podría aumentar la fluorescencia de los mismos debido a la restricción conformacional que ocurriría en el proceso de intercalación con ADN. Los resultados experimentales muestran el efecto contrario, observándose una disminución en esta intensidad de fluorescencia en presencia de ADN en la mayoría de los compuestos sintetizados. Este comportamiento podría deberse a que los sustituyentes no se vean involucrados en la intercalación y por ello conserven su movilidad rotacional manteniendo su libertad de giro. Otra posible explicación podría ser que estos ligandos tuviesen mayor tendencia a la autoagregación que afinidad por el ADN, con lo cual se estaría observando un *autoquenching* en la intensidad de fluorescencia. Sean estas u otras las causas por las cuales no se produce un aumento de la intensidad de fluorescencia en el proceso de intercalación, estos resultados parecen descartar a esta serie de compuestos como candidatos de interés para ser tomados como modelo para la obtención de sondas de ADN tipo *light-up*.

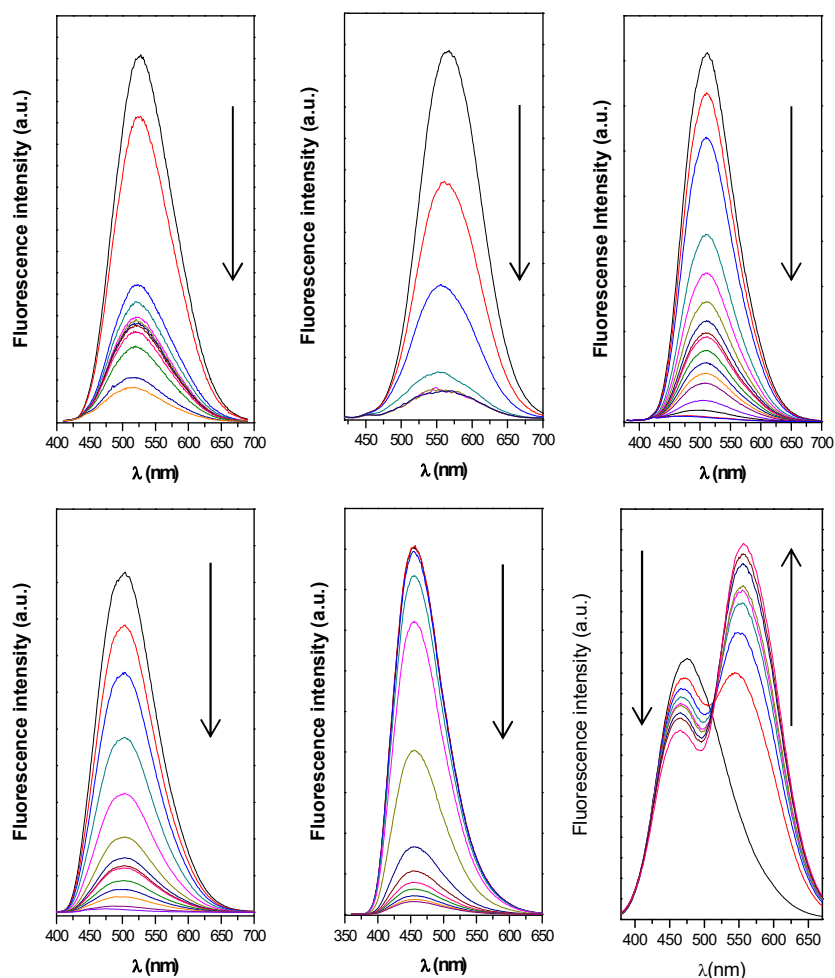


Figura 71. Espectros de emisión obtenidos en valoraciones de los ligandos con ADN de timo bovino. Panel superior de izquierda a derecha: **13, 14 y 31**. Panel inferior de izquierda a derecha: **35, 37 y 39**

Los espectros de excitación obtenidos para los cromóforos de esta familia presentan las mismas características que los espectros de absorción y, en todos los casos, se observa una disminución de la intensidad de las bandas tras la adición de alícuotas de ADN a la muestra.

Los datos de intensidad de fluorescencia y los ratios molares ADN/ligando obtenidos de la valoración espectrofluorimétrica de estos cromóforos se introdujeron en la ecuación 5 del apartado de Materiales y Métodos para obtener los valores de las constantes de afinidad de los ligandos y el número de pares de bases por cada ligando unido (n). Los valores obtenidos

para las constantes de afinidad son sorprendentemente altos, mientras que los valores de n son muy bajos. Estos resultados se pueden interpretar asumiendo que se puedan producir fenómenos de agregación cromóforo:ADN muy rápida (Figura 72). Otra explicación podría ser que la ecuación usada para este modelo no sea adecuada para este tipo de ligandos, o a que las bajas intensidades de las bandas de emisión y excitación en el límite de detección del instrumento no den medidas fiables a ratios elevados DNA/ligando. En cualquier caso, los espectros estarían probando que se está produciendo unión a ADN pero no se podrían obtener datos cuantitativos fiables del estudio de estos compuestos.

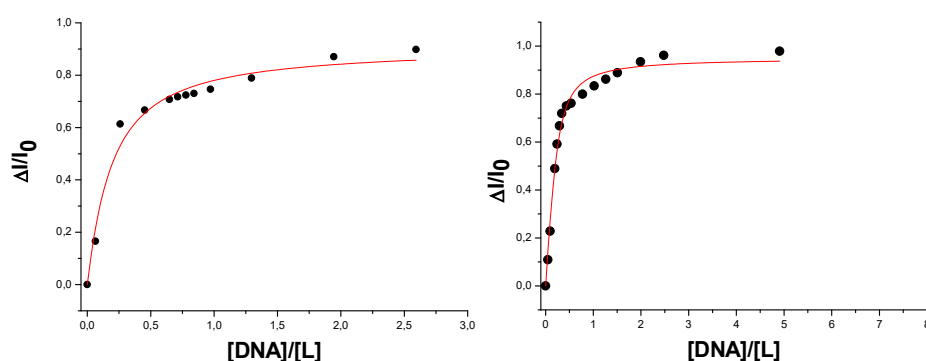


Figura 72. Ajuste de los datos obtenidos de las valoraciones espectrofluorimétricos de los ligandos **13** (izquierda) y **14** (derecha) a la ecuación 5

Los valores de la anisotropía de fluorescencia (r) y sus signos denotan diferentes orientaciones en los momentos de transición de absorción y emisión, tamaños moleculares y difusión rotacional en un disolvente de viscosidad baja. Lo esperado era un aumento en los valores de r tras la adición de ADN debido a un aumento del orden en el sistema. Sin embargo, los valores obtenidos para todos los compuestos de esta serie son muy bajos, en torno a 0, y apenas varían con la adición de alícuotas de ADN, lo cual está en contradicción con los altos valores obtenidos en las constantes de afinidad. Este hecho podría atribuirse, una vez más, a las bajas intensidades de fluorescencia obtenidas para los cromóforos de esta serie, las cuales se encuentran en el límite de detección del instrumento, y ello lleva a cuestionar la fiabilidad de los datos de anisotropía obtenidos (Figura 73).

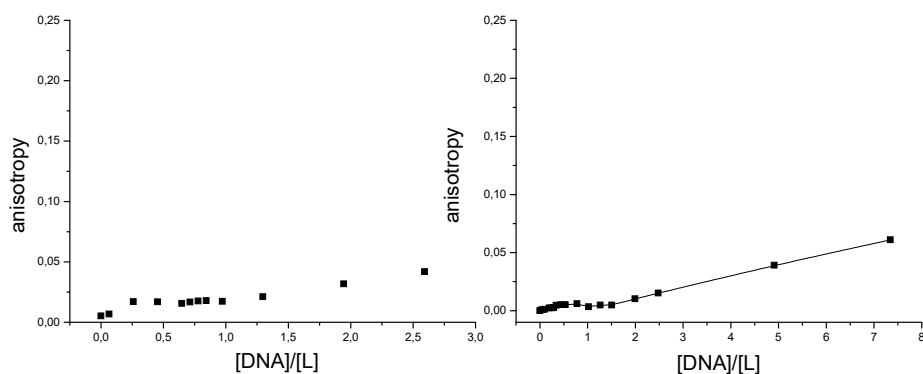


Figura 73. Datos de la anisotropía de fluorescencia de los ligandos **13** (izquierda) y **14** (derecha) frente a los ratios [ADN]/[L]

4.2.2. Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular para las disoluciones de los cromóforos **13**, **14**, **35**, **37**, y **39** se obtuvieron en presencia y ausencia de ADN.

En primer lugar se analizó la zona del espectro correspondiente a las señales de la molécula de ADN. Se observó el solapamiento de las señales correspondientes al apilamiento y la helicidad del ADN centradas a ≈ 278 y ≈ 245 nm,^{255, 257, 258} con las señales propias de los cromóforos, los cuales poseen bandas a estas longitudes de onda. Por esta razón no se puede analizar la variación en el espectro de dicroísmo circular del ADN al asociarse a los ligandos (figura 74).

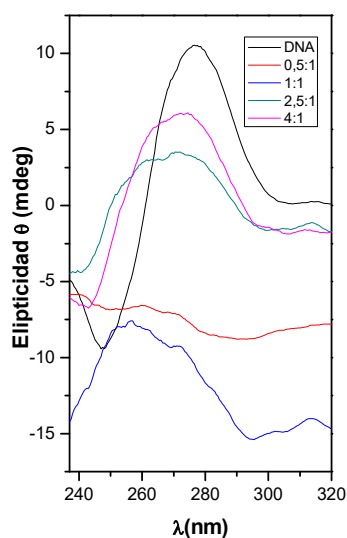


Figura 74. Espectro de CD para la zona en la que absorbe la molécula de ADN asociado con el ligando **13**.

Los espectros de ICD para los cromóforos **13** y **37** mostraron señales negativas (Figura 75), las cuales se hacen más intensas al aumentar la cantidad de ADN en la muestra. El efecto Cotton negativo en estos cromóforos y las intensidades en sus bandas sugieren que el cromóforo intercala el ADN y sus momentos de la transición se encuentran orientados a lo largo del eje mayor del bolsillo formado entre los pares de base de ADN. Es de destacar en el ligando **13** que a partir del ratio 1 mol ADN/1 mol de ligando, las intensidades en las señales permanecen constantes, lo que sugiere que a esa concentración se ha alcanzado la máxima ocupación de los sitios de unión avalando la hipótesis de una asociación rápida entre el cromóforo y el ADN observada en las valoraciones espectrofluorimétricas.

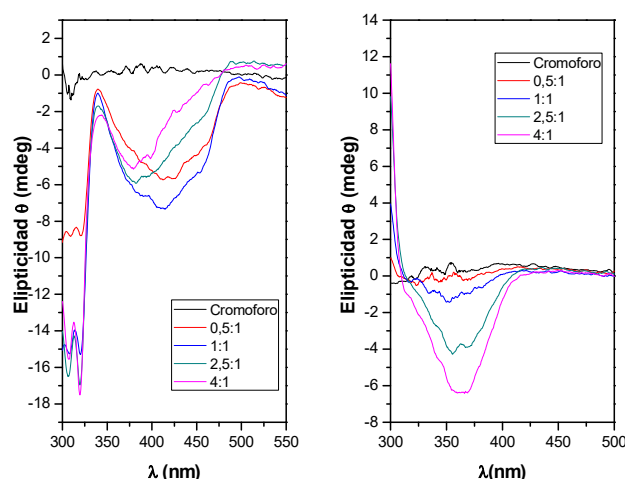


Figura 75. Espectros de ICD para los ligandos **13** (izquierda) y **37** (derecha)

En el caso de los ligandos **14** y **35** (Figura 76), se observó que la mayor intensidad en la señal de ICD se observa a ratios de 0,5 moles de ADN/1 mol de ligando. Esto sugiere una

complejación rápida alcanzando el máximo de agregación a este ratio molar. Las señales disminuyen en intensidad al aumentar la cantidad de ADN en la muestra.

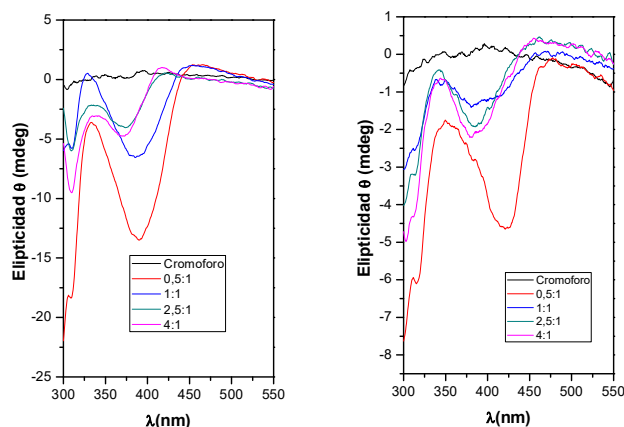


Figura 76. Espectros de ICD para los ligandos **14** (izquierda) y **35** (derecha)

En el espectro de ICD del ligando **39** (Figura 77) se observan unas bandas positivas muy intensas que aumentan según aumenta la cantidad de ADN en el sistema. La elevada intensidad mostrada en estas bandas puede sugerir que este cromóforo no se esté uniendo al ADN por intercalación sino que lo esté haciendo a través de los surcos. La no intercalación de este cromóforo puede estar relacionada con su estructura de solo tres anillos fusionados, a la cual también se le podría unir la movilidad de los tres sustituyentes.

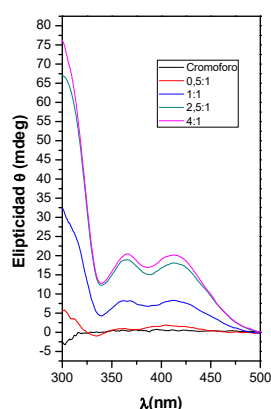


Figura 77. Espectro de ICD para el ligando 39

4.3. Cationes derivados de piridoimidazopiridazinio no sustituidos

4.3.1. Valoración de fluorescencia de los derivados de piridoimidazopiridazinio no sustituidos con ADN de timo bovino

Una vez obtenidos los espectros de absorción y de emisión de los compuestos **40** y **41**, así como los parámetros fotofísicos derivados de ellos, se realizaron valoraciones de fluorescencia utilizando ADN de timo bovino para, de esta manera, determinar la afinidad por ADN de estos cromóforos.

Como se muestra en la figura 78, apenas se observó desplazamiento en los máximos de emisión para los dos ligandos tras la adición de alícuotas de ADN, pero sí cambios bastante significativos en la intensidad de fluorescencia. Las concentraciones iniciales de los cromóforos **40** y **41** en disolución fueron de $2,31 \times 10^{-5}$ mol/L y $3,0 \times 10^{-5}$ respectivamente. Tras adiciones sucesivas de ADN, el compuesto **41** mostró un aumento en la intensidad, mientras que se observó una disminución para el ligando **40**. Además, en el caso del compuesto **41**, se apreció la aparición de una nueva banda a ≈ 482 nm y un hombro a aproximadamente 560 nm, hombro que también se hizo patente para el compuesto **40**.

Como en casos anteriores también se estudiaron sus espectros de excitación, la variación sufrida por estos tras la adición de ADN de timo bovino y la variación en la anisotropía de fluorescencia. Los espectros de excitación (Figura 79) presentaron características similares a

los espectros de absorción de los ligandos **40** y **41**. Al igual que en el caso de los espectros de emisión de ambos cromóforos, el compuesto **41** mostró un aumento en la intensidad de fluorescencia mientras que el compuesto **40** mostró una disminución. También se puede observar la variación en la anisotropía de fluorescencia r monitorizada en el máximo de emisión, usando para la excitación el máximo de excitación obtenido a 25°C. Los valores de r para las disoluciones de los compuestos **40** y **41** en ausencia de ADN indican diferentes orientaciones en los momentos de transición en absorción y emisión o difusión rotacional en un medio acuoso de baja viscosidad a 25 °C. Los valores de r aumentan de manera notable tras la adición de alícuotas de ADN, tendencia típica en la formación de complejos **40**:ADN y **41**:ADN cuyos tiempos de relajación rotacional son mayores comparados con los del ligando libre.¹⁶⁴ El conjunto de los datos obtenidos para **40** y **41** avala la unión de ambos cromóforos a ADN.

Figura 78. Espectros de emisión para los ligandos **41** (izquierda) y **40** (derecha) en DMSO/Agua al 5% ($[L] = 3,0$ y $2,31 \times 10^{-5}$ mol/L, respectivamente) y tras la adición de alícuotas de ADN

Una vez obtenidos los espectros de emisión, excitación y la anisotropía de fluorescencia en presencia y ausencia de ADN de timo bovino, se procedió a normalizar las intensidades de fluorescencia $((I-I_0)/I_0)$ donde I representa el valor de la integral de la banda de emisión e I_0 el valor en ausencia de ADN) para que todos los espectros fuesen comparables y se representaron como función de los ratios molares ADN/Ligando (figura 80)

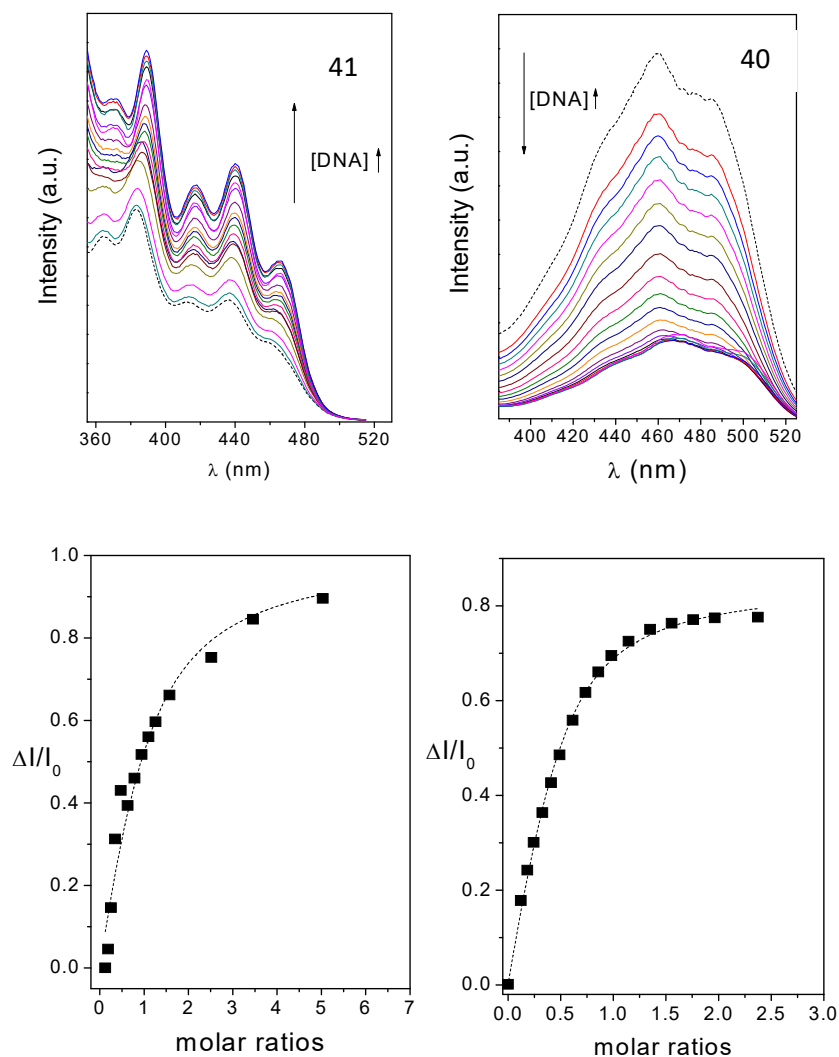


Figura 79. (Paneles superiores) Cambios en los espectros de excitación para los compuestos **41** (izquierda) y **40** (derecha) en DMSO/agua al 5% ($3,0 \times 10^{-5}$ y $2,31 \times 10^{-5}$ mol/L, respectivamente) tras la adición de alícuotas de ADN. (Paneles inferiores) Variación normalizada de la intensidad de fluorescencia para el compuesto **41** (izquierda) y compuesto **40** (derecha) medidos en DMSO/agua 5% enfrentados con los ratios molares DNA/Ligando (Las intensidades de fluorescencia se recogieron a los máximos de emisión, 515 y 538 nm respectivamente)

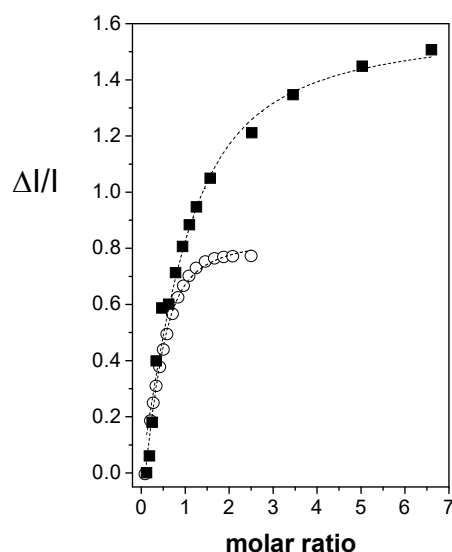


Figura 80. Variación normalizada de las intensidades de fluorescencia para los ligandos **41** (•) y **40** (o) en DMSO/agua al 5% ($[41] = 3,0 \times 10^{-5}$ mol/L y $[40] = 2,31 \times 10^{-5}$ mol/L) a 25°C contra los ratios molares ADN/Ligando

Las curvas mostradas en la figura 80 para las valoraciones de los compuestos **40** y **41** son el resultado del ajuste de los datos experimentales a la ecuación 3 en el apartado Materiales y métodos. De este ajuste se obtiene un valor para la constante de unión del compuesto **41** de $(6.7 \pm 3.6) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, con un orden de magnitud similar a otras constantes publicadas anteriormente para otros intercalantes derivados de quinolizinio.^{3,5} El número medio de pares de bases (n) necesarias para unir un ligando fue de 0.9 ± 0.4 . En el caso del compuesto **40** se halló una constante de unión al ADN de $(4.5 \pm 1.1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, un orden de magnitud superior a la encontrada para el compuesto **41**, y un valor de n de $0,6 \pm 0.1$, menor al hallado para el compuesto **41**, lo que indicaría una unión más fuerte al ADN por parte de este ligando.

4.3.2. Medidas de tiempo de vida media en presencia de ADN de timo bovino

Los perfiles de decaimiento y los tiempos de vida media también se obtuvieron para los ligandos **40** y **41** en ausencia y presencia de ADN a distintos ratios ligando:ADN. Los perfiles de decaimiento de la intensidad de fluorescencia en ausencia de ADN para estos ligandos se ajustaron a una función biexponencial de decaimiento con componentes en el tiempo de vida de 9,4 ns y 26,1 ns para el ligando **40** y 6,9 ns y 17,1 ns para el ligando **41** y unos tiempos de vida media (τ) de 10,0 ns y 8,9 ns respectivamente. La observación de perfiles biexponenciales

hace pensar en procesos de agregación intermoleculares por parte de los ligandos en el estado excitado. La presencia de ADN hace los perfiles más complejos pasando de decaimientos biexponenciales a triexponenciales, lo que da pie a pensar en la aparición de nuevas especies en disolución en el estado excitado. Se ha observado una disminución de los tiempos de vida media tras la adición de alícuotas de ADN para ambos compuestos siendo esta disminución mayor para el ligando **40**, como se observa en la tabla 9. Esta disminución en los tiempos de vida media de los ligandos puede corresponderse con la existencia de una reacción de transferencia de electrones fotoinducida entre estos cationes y las bases del oligonucleótido, que ya ha sido descrita previamente para otros cationes tipo azonia.^{252-254, 3}

Tabla 9. Tiempo de vida media para los ligandos **40** y **41** en DMSO/agua al 5% en ausencia y en presencia de ADN a diferentes ratios molares DNA/Ligando a 25%. La fuente de excitación fue un nanoled con emisión a 335nm

DNA/L ratios	< τ >, ns	DNA/L ratios	< τ >, ns
L = 40		L = 41	
0	10.0	0	8.9
0.5	8.4	0.4	7.9
1.0	8.3	0.8	7.6
1.5	7.5	1.2	7.4
2.5	5.5	1.6	7.4
4.0	5.8	2.4	7.4

4.3.3. Dicroísmo circular

Como se aprecia en la figura 81, el ADN de timo bovino muestra el típico espectro de dicroísmo circular de la forma B del ADN con bandas de efecto Cotton positiva y negativa centradas a aproximadamente 275 y 245 nm. Estas bandas, atribuidas al apilamiento de bases y la orientación hacia la derecha de la helicidad en la cadena de ADN, son sensibles al modo de interacción entre el ADN y moléculas pequeñas.^{176, 258} Por ello, las intensidades de ambas disminuyen tras aumentar la concentración de ligando para el compuesto **41**, mientras que muestran un descenso en la intensidad de la banda situada a 245 nm y un aumento de la banda situada a 275 nm para el cromóforo **40**. Como en el caso de la familia anterior, ambos ligandos absorben también en esta región, una señal de dicroísmo circular inducido (ICD) del complejo ADN/Ligando podría aparecer también en esta zona, y esto es lo que se observa en

los espectros de los complejos **40**:ADN y **41**:ADN, en donde el ADN se encuentra en muy baja concentración. Como consecuencia de este fenómeno, se cree que el espectro de CD en esta región es el resultado de la superposición de los espectros de CD del ADN y de los espectros de ICD del complejo ADN/Ligando, lo que puede plantear dudas sobre conclusiones planteadas por otros autores,^{176, 258, 259} los cuales, no proponen esta superposición de señales asignando a esta zona señales únicamente fruto del efecto Cotton del ADN.

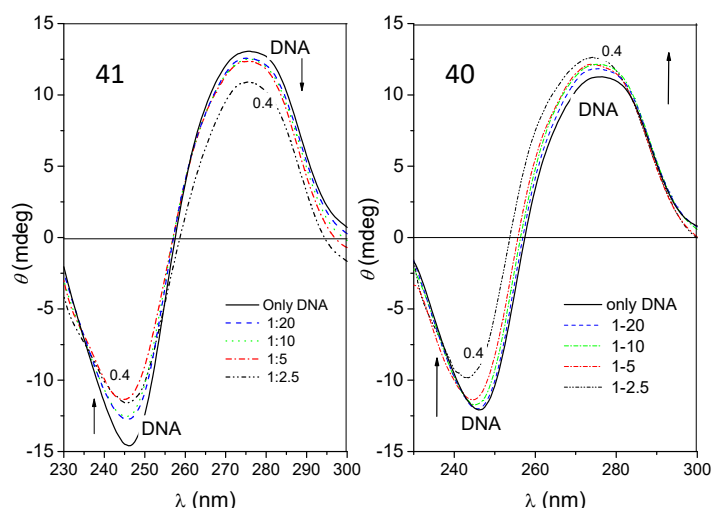


Figura 81. Espectro de CD (elipticidad θ) en la región en la cual absorbe el ADN a 25°C para los ligandos **41** (izquierda) y **40** (derecha) en DMSO/agua al 5% en presencia de ADN ($[\text{ADN}] = 7,20 \times 10^{-4}$ y $6,7 \times 10^{-4}$ mol/L, respectivamente) a distintos ratios molares ADN/Ligando

Los espectros de ICD observados a partir de una longitud de onda de 300 nm son atribuidos a la interacción ADN/Ligando, debido a que es el ligando el que absorbe predominantemente en esta zona donde el ADN no presenta absorción. La magnitud y el signo de los espectros de ICD dependerán de la orientación de los momentos de transición dentro del sitio de unión y de los desplazamientos laterales del intercalante con respecto al eje de la hélice de ADN

Los espectros de ICD de los ligandos **40** y **41** aislados en disolución y en presencia de ADN a distintos ratios molares Ligando-ADN, donde la concentración de ADN permanece constante, se muestran en la figura 82. Si bien no se observaron señales para los compuestos aislados, para los complejos **40**:ADN y **41**:ADN se pudo apreciar un efecto Cotton a cualquier ratio, dependiendo la intensidad del mismo de la concentración del ligando. Por otro lado, los espectros de ICD para ambos complejos a cualquier ratio molar a estas concentraciones no

mostraron la presencia de señales propias de acoplamiento de los estados excitados de dos cromóforos en el estado excitado, de elevada absortividad y que se encuentran próximos en el espacio, los llamados excitones. Esto hace pensar en la ausencia de una agregación entre moléculas de ligando durante la asociación con el ADN.^{256, 262, 260, 261}

Las elipticidades molares permiten la visualización del espectro de ICD en dos regiones distintas, dado que al dividirlo entre la concentración a la que está el ligando en disolución, dos espectros en dos regiones distintas se vuelven comparables. Las bandas observadas en los espectros de ICD se corresponden con las regiones que se observan en los espectros de absorción. En el caso del compuesto **41**, una de estas bandas, la cual es negativa, se extiende por debajo de 350 nm y la otra, que es casi 0, cubre la región a partir de 350 nm. En el caso del compuesto **40**, se puede hacer también esta distinción, pero el punto donde cambia el signo de la banda se encontraría en torno a 380 nm. Ambas bandas fueron negativas para las longitudes de onda de mayor energía y ligeramente positivas para las menos energéticas. Se puede asumir para ambos compuestos, que las bandas que aparecen a longitudes de onda de baja energía sugieren una orientación perpendicular de los compuestos al eje mayor del sitio de unión al ADN. El signo negativo de las bandas a longitudes de onda menores indica que el modo de unión es el de un intercalante; y también indica que el eje mayor del cromóforo se encuentra paralelo al eje mayor del sitio de unión.^{256, 260, 261, 5} Además, la ausencia y la poca intensidad en las bandas positivas plantea un momento de transición del ligando paralelo al eje de la zona de unión al ADN. Se puede decir, por tanto, que la orientación espacial del cromóforo es de unos 45° (o ligeramente inferior) con respecto del eje mayor de la zona de unión del ADN. Además, la ausencia de una gran banda positiva excluye la posibilidad de que la interacción ADN/Ligando sea unión al surco y, en consecuencia, estas señales indican que estos compuestos se encuentran intercalando la molécula de ADN.

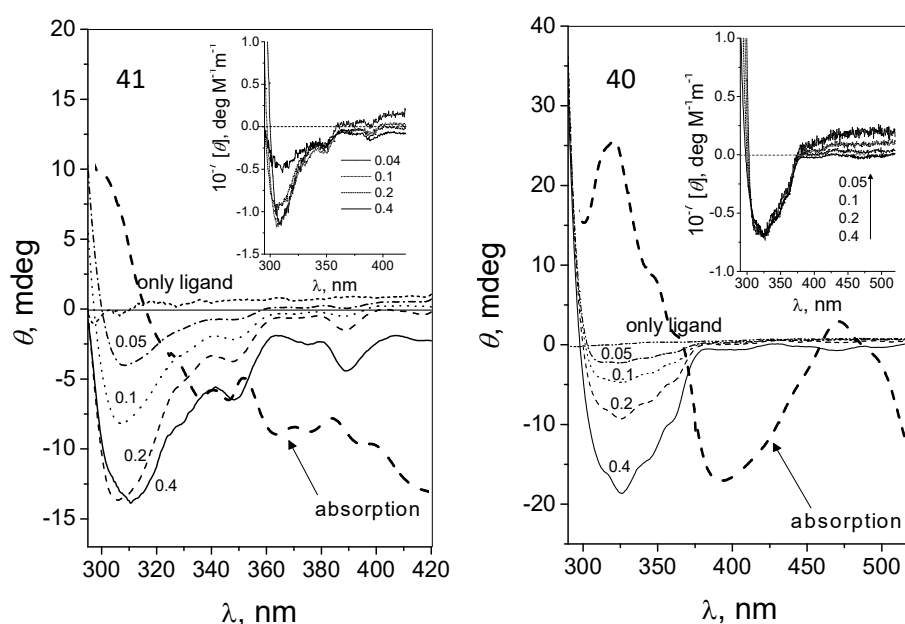


Figura 82. Elipticidad θ para los ligandos **41** y **40** en DMSO/agua al 5% en presencia de ADN ($[\text{ADN}] = 7,20 \times 10^{-4}$ y $6,7 \times 10^{-4}$ mol/L, respectivamente) a distintos ratios molares ADN/Ligando a 25°C . El espectro de CD representado como elipticidad molar esta sobreimpreso. También se encuentra sobreimpreso el espectro de absorción para los ligandos **41** y **40** (---)

4.4. Cationes derivados de piridoimidazopiridazinio sustituidos²⁴⁹

4.4.1. Valoración de fluorescencia de los derivados sustituidos de piridoimidazopiridazinio con ADN de timo bovino

La figura 83 muestra los espectros de emisión para los cromóforos a concentraciones del orden de 10^{-5} - 10^{-6} mol/L estudiados en este apartado en presencia y ausencia de ADN de timo bovino.

Los espectros de emisión para esta serie de cationes (figura 83) fueron similares, mostrando una banda única en el caso de los compuestos con un sustituyente arilo en posición C11, como es el caso de los ligandos **53**, **54** y **55**, o mostrando bandas dobles de emisión (**50**, **52**, **56** y **57**). Para estos últimos la adición de ADN a los ligandos significó un cambio en la relación de

intensidades de sus bandas de emisión, aumentando una de ellas más que la otra. Cabe resaltar que las intensidades de fluorescencia para casi todos los cromóforos aumentaron en mayor o menor medida durante las valoraciones con ADN. La excepción fue para el compuesto **55** cuya fluorescencia intrínseca era muy baja (tabla 10) y disminuyó tras la adición de ADN. Las bandas en todos los casos experimentaron un desplazamiento hacia longitudes de onda más energéticas de su máximo tras la adición de ADN.

Los espectros de excitación (figura 84) fueron recogidos en el máximo de emisión y presentaron características similares a sus espectros de absorción correspondientes. La variación de intensidades tras la adición de ADN se comportó de manera similar a la observada en sus espectros de emisión correspondientes.

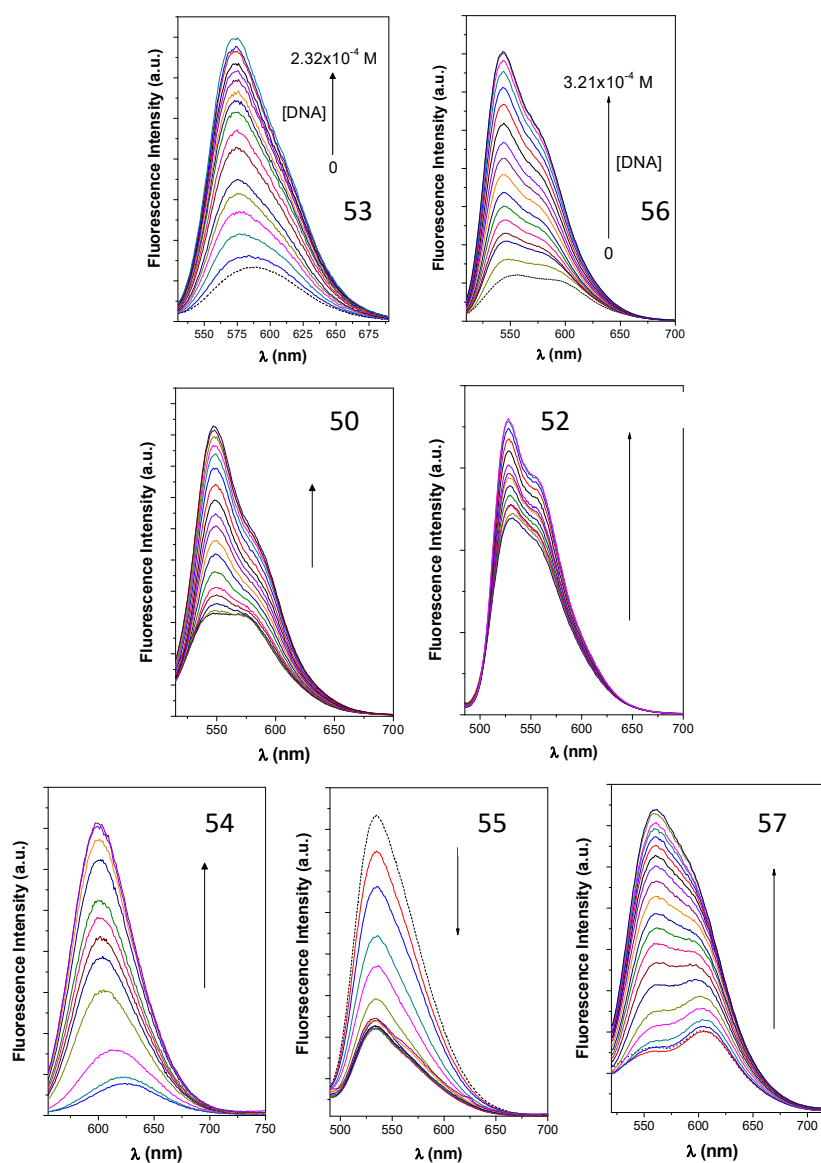


Figura 83. (Paneles superiores) Espectros de emisión a 25°C del ligando **53** (izquierda) y **56** (derecha) en una mezcla agua/DMSO al 5% libres y tras la adición de alícuotas de ADN ($[53]=8.27 \times 10^{-6} \text{M}$, $[56]=1.16 \times 10^{-5} \text{M}$). (Paneles medios e inferiores) Espectros de emisión para los compuestos **50**, **52**, **54**, **55** y **57** a 25°C en una mezcla agua/DMSO al 5% libres y tras la adición de alícuotas de ADN

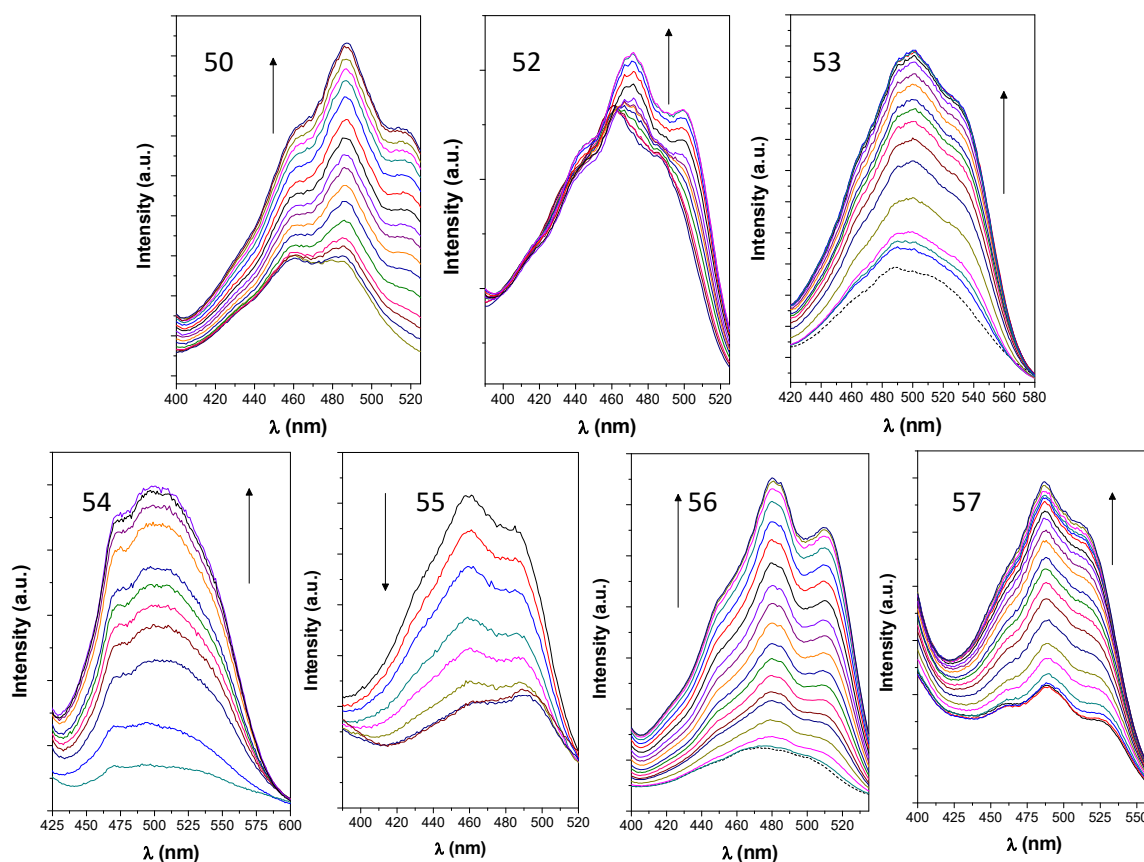


Figura 84. Espectros de excitación de los ligandos (panel superior de izquierda a derecha) **50**, **52**, **53** y (panel inferior de izquierda a derecha) **54**, **55**, **56** y **57** en disolución en una mezcla de agua/DMSO al 5% a 25°C con el ligando libre y tras adicionar alícuotas de ADN (λ_{em} se fijó al máximo de las intensidades de emisión para cada ligando)

Las curvas mostradas en la figura 85a, resultado del ajuste de los datos experimentales a la ecuación 3 del apartado Materiales y métodos, dan información sobre los valores de las constantes de asociación K y los valores de n (tabla 10). La forma de las curvas indica que hay una interacción de unión en mayor o menor medida para todos ellos con ADN. Los valores de la constante de afinidad K se encuentran en un orden de magnitud de 10^4 M.^{134, 3, 158, 263} La media en el número de pares de base por ligando unido fue de un rango aproximado de 2 a 9. Los ajustes para el ligando **55**, cuya intensidad de fluorescencia disminuía en presencia de ADN, mostraron una constante de asociación de un orden de magnitud mayor al de los demás

ligandos y un sorprendentemente bajo valor de n (por debajo de 1). Esto muestra en el complejo **55**:ADN una fuerte interacción y parece que el sistema no cumple con los requisitos para aplicarle la ecuación 3.

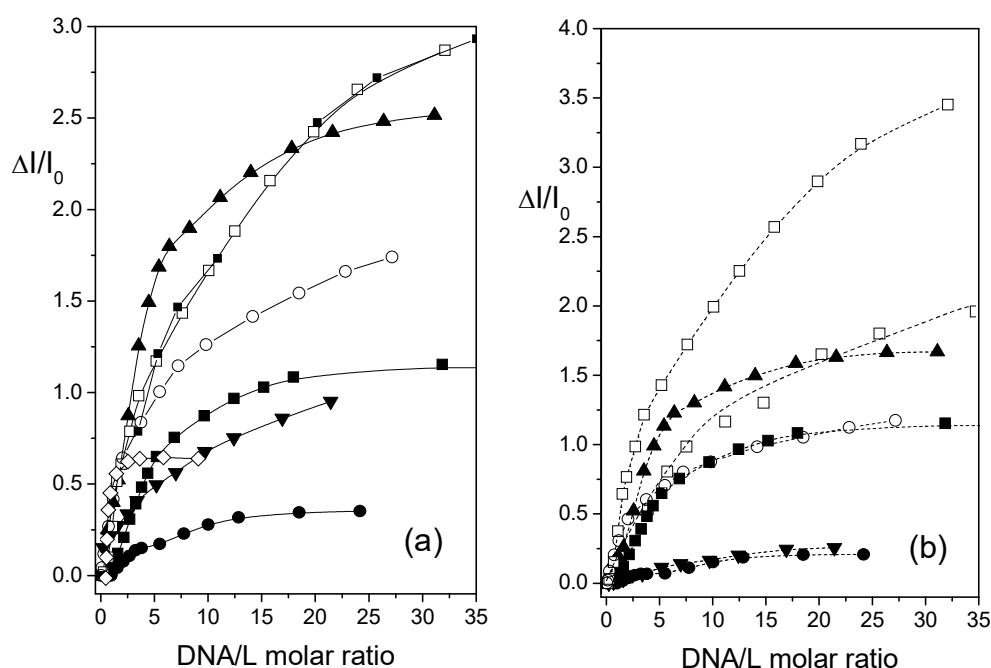


Figura 85. Cambios normalizados en la intensidad de fluorescencia para el resto de los ligandos en una mezcla agua/DMSO al 5% a 25°C obtenidos del espectro de emisión (a) y del espectro de excitación (b) frente a los ratios molares ADN/ligando durante las valoraciones. Los símbolos son **50** (■), **52** (●), **53** (▲), **54** (▼), **55** (△), **56** (□) y **57**. (○)

Las curvas la figura 85b reproducen el ajuste a la ecuación 3 de los datos experimentales obtenidos de los espectros de excitación mediante el uso de K y n previamente calculados para los espectros de emisión y de esta manera observar el ajuste de estos parámetros a las curvas obtenidas experimentalmente de los espectros de excitación.

Como parte de este análisis se observaron los cambios en la anisotropía de fluorescencia (r) para esta familia. Los ligandos catiónicos incluido **55** mostraron incrementos similares en r tras

la adición de alícuotas de ADN (figura 86), lo cual es esperable cuando hay una complejación entre los ligandos y el ADN.

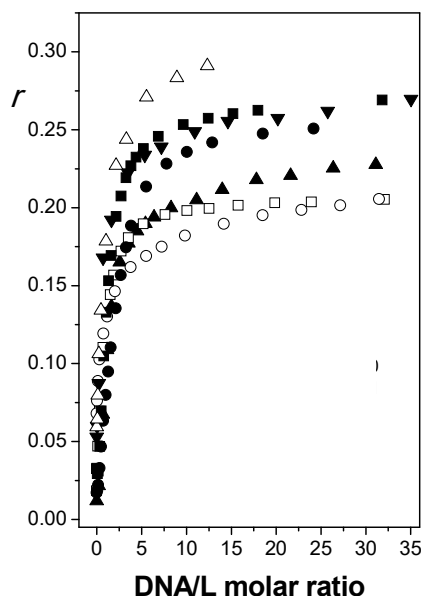


Figura 86. Cambios en las anisotropías de fluorescencia (r) para los ligandos **50** (■), **52** (●), **53** (▲), **54** (▼), **55** (△), **56** (□) y **57** (○) en una mezcla agua/DMSO al 5% a 25°C durante las valoraciones frente a la concentración molar de ADN. Las medidas se llevaron a cabo en cubetas con 1 cm de paso óptico

Una forma de medir el incremento en la intensidad de fluorescencia (o descenso en el ligando **55**) tras la unión con ADN es mediante los ratios en las intensidades de fluorescencia (intensidades normalizadas I_{∞}/I_0 , I medido como el área bajo la curva e I_0 es el área bajo la curva en ausencia de ADN). En este caso, se observan aumentos en la intensidad de fluorescencia de hasta casi 4 veces la intensidad de fluorescencia inicial en varios de los cromóforos estudiados, alcanzando el valor más alto en el caso del ligando **56**.

Tabla 10. Datos obtenidos de las valoraciones de fluorescencia

Compuesto	I_{∞}/I_0	$10^4 K(M^{-1})$	n
50	3,60	$9,6 \pm 1,1$	$8,5 \pm 0,8$
52	1,35	$3,7 \pm 2,8$	$8,6 \pm 1,4$
53	2,04	$7,7 \pm 2,2$	$4,8 \pm 0,7$
54	3,62	$1,8 \pm 0,4$	$7,7 \pm 1,4$
55	0,33	10^6	$n < 1$
56	3,95	$0,96 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,2$
57	3,30	$3,7 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,2$

Al observar que el mejor aumento en la intensidad de fluorescencia para las moléculas de esta familia de cationes dibenzopiridoimidazocinolinio era la presentada por el compuesto **56**, se llevó a cabo una comparación más detallada de la diferencia de comportamiento al unirse al ADN de este compuesto y su isómero el ligando **53**. Ambos presentaban buenas propiedades fotofísicas y aumentos significativos en la intensidad de fluorescencia en el proceso de la intercalación [**53** (x2,04) y **56** (x3,95)] así como para ser sondas tipo *light-up*.

Estas medidas se realizaron en una mezcla de agua y DMSO al 5% y, tras la adición de ADN durante las valoraciones, el espectro del compuesto **53** mostró una banda centrada a 587 nm mientras que en el espectro de **56** se observó una banda centrada a 557 nm, la cual va acompañada de un hombro situado a 589 nm. Se apreció, como se ha mencionado anteriormente, un desplazamiento hipsocrómico de aproximadamente unos 15 nm durante la valoración para el ligando **53**. El ligando **56** experimentó un incremento en la intensidad del pico relativa a la intensidad de su hombro (Figura 83).

Las figuras 87a y 87b muestran la variación normalizada de las intensidades de fluorescencia de **53** y **56** calculada como $(I-I_0)/I_0$ frente al ratio molar de [ADN]/ligando obtenido de los espectros de emisión y excitación a 25°C.

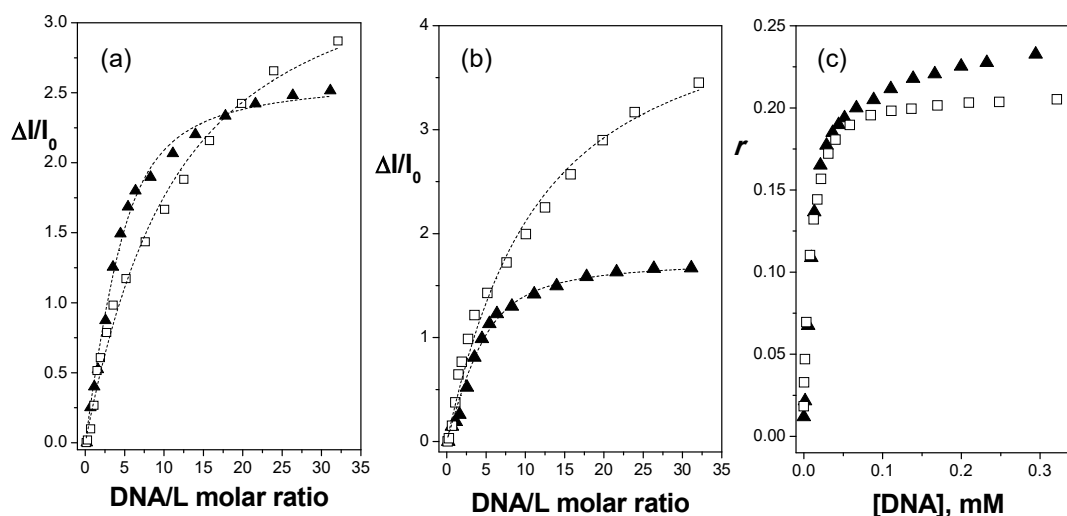


Figura 87. Variación normalizada de la intensidad de fluorescencia ($\Delta I/I_0$) obtenida de los espectros de emisión (a) y excitación (b) para los ligandos **53** (▲) y **56** (□) en disolución en una mezcla agua/DMSO al 5% ($[53]=8,27 \times 10^{-6}$ M, $[56]=1,16 \times 10^{-5}$ M) frente a los ratios molares ADN/ligando (R) durante las valoraciones. (c) Cambios en la anisotropía de fluorescencia (r) frente [DNA]

La figura 87c muestra también la variación de la anisotropía de fluorescencia (r) monitorizada en el máximo de emisión, frente a la concentración de ADN. Los valores para r en los ligandos **53** y **56** en disolución a 25°C en ausencia de ADN muestran diferentes orientaciones en los momentos de transición en absorción y emisión y/o difusión rotacional en un medio de baja viscosidad como es una disolución acuosa. Los valores de r para ambos ligandos aumentan con la concentración de ADN, lo cual es un comportamiento típico en la formación de complejos ligando:ADN, cuyos tiempos de relajación rotacional son mayores que los comparados con los ligandos libres.

4.4.2. Tiempos de vida media en presencia de ADN de timo bovino

Este estudio se realizó para observar las variaciones en los tiempos de vida media de los cromóforos en ausencia o presencia de ADN. Los perfiles de decaimiento de estos ligandos libres fueron obtenidos a 25°C y a baja concentración en una mezcla H₂O y DMSO al 5% (tabla 7). Se ajustaron a una ecuación biexponencial de decaimiento dando la media ponderada de

los tiempos de vida media ($\langle\tau\rangle$) de 5,4 ns para el ligando **53** y 7,5 ns para el ligando **56** (ecuación 5). La presencia de ADN hizo que los perfiles de decaimiento fuesen más complejos (decaimientos triexponenciales). Se esperaba que la interacción entre las bases del ADN y los ligandos desembocase en una reacción de transferencia de electrones fotoinducida lo cual disminuiría los tiempos de vida media del ligando complejoado con el ADN. Sin embargo, las medias de los tiempos de vida media observados para los ligandos **53** y **56** en presencia del ADN fueron de $5,5 \pm 0,2$ y $7,2 \pm 0,8$ respectivamente. No se observaron variaciones aparentes en el tiempo de vida media con los ratios Ligando:ADN y esto puede ser debido a que la disminución de estos valores se encontrase por debajo del límite de detección del instrumento.

4.4.3. Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular (CD) de los compuestos **53** y **56** en la región donde absorbe el ADN, que se muestran en la figura 88. Como en estudios precedentes descritos en esta Discusión de Resultados, se usó ADN de timo bovino, que muestra las bandas típicas del espectro de la forma B con bandas de signo opuesto, teniendo la banda positiva en torno a 278 nm y la negativa a 245 nm debido al apilamiento de bases y la helicidad a la derecha de la cadena polinucleotídica respectivamente.¹⁷⁶ De acuerdo con algunos autores, las interacciones electrostáticas de moléculas pequeñas con ADN y la unión al surco de estas moléculas no muestra ninguna perturbación en ambas bandas, aunque en el caso de la intercalación, debido a interacciones de apilamiento de bases muy fuertes y conformaciones muy fuertes de ADN, por lo general aumenta la intensidad de ambas bandas.^{255, 257-259} Sin embargo, muchos otros autores aseguran que la intercalación interrumpe las interacciones entre bases, debilitando de esta manera, el apilamiento entre bases y por tanto disminuyendo la intensidad de ambas bandas.²⁶²

Como se observa en la figura 88 la intensidad de la banda negativa de alta energía (≈ 245 nm) disminuye tras el aumento de las concentraciones de los ligandos **53** y **56**. No obstante, se observó un incremento en la intensidad de la banda positiva (≈ 278 nm). Como sucede con otros intercalantes, estos ligandos absorben por debajo de 300 nm donde se encuentra la banda de baja energía del ADN. Teniendo en cuenta que la probada interacción entre los ligando con el ADN (valoraciones de fluorescencia), induce una quiralidad en estos cationes aquirales, estos compuestos presentaran una señal distinta de cero en los espectros de dicroísmo circular, y en consecuencia, el espectro de dicroísmo circular inducido (ICD) del ligando complejoado se solapa al del ADN modificando la tendencia en su intensidad esperada con los ratios Ligando:ADN.²⁶³

La observación en la figura 89 de una señal de CD en la región donde los ligandos catiónicos predominantemente absorben es consecuencia de la formación de complejos con el ADN, y como se acaba de mencionar, esta complejación induce quiralidad en los cromóforos presentando un espectro de ICD. Como ya se ha mencionado en capítulos anteriores, un intercalante muestra una banda negativa de ICD cuando su momento de transición para la correspondiente banda de absorción está orientado de manera paralela al eje del bolsillo formado por el par de bases; y muestra una banda positiva de ICD cuando su momento de transición para la correspondiente banda de absorción está orientado de manera perpendicular al eje del bolsillo formado por el par de bases.^{256, 176, 3, 260, 261}

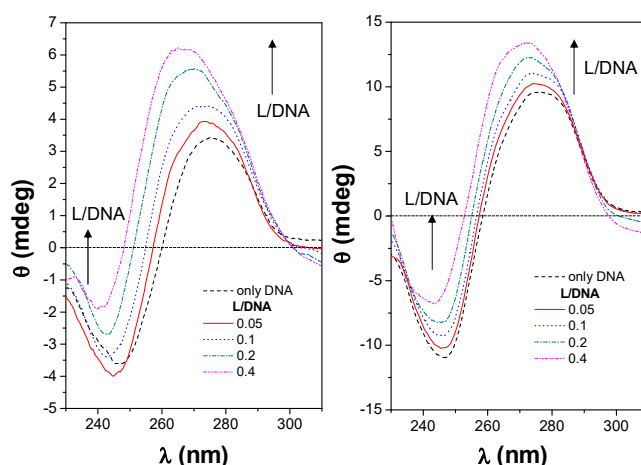


Figura 88. Espectro de CD (elipticidad, θ) en la región de absorción del ADN para **53** (izquierda) y **56** (derecha) en una mezcla agua/DMSO al 5% en presencia de ADN ($[ADN]=7,20 \times 10^{-4} M$ y $6,70 \times 10^{-4} M$ respectivamente) a distintos ratios ligando/ADN medidos a $25^\circ C$ (cubetas con 0.1 cm de paso óptico)

La figura 89 muestra los espectros de ICD para los ligandos catiónicos **53** y **56**, libres y en presencia de ADN a diferentes ratios molares Ligando:ADN manteniendo la concentración de ADN constante. Apenas se obtuvo señal alguna de las disoluciones de los ligandos **53** y **56**. Los espectros de CD para las disoluciones de ADN en presencia de los ligandos a cualquiera de los ratios usados mostraron el efecto Cotton que, aunque bajo, su intensidad dependía de los ratios molares Ligando:ADN. En ambos espectros se aprecia la ausencia de acoplamiento excitónico rechazando cualquier agregación de ligando potencial a las concentraciones usadas.^{3, 260} La figura 90 muestra los espectros de ICD obtenidos como elipticidades molares ($[\theta]$), de esta manera se elimina la influencia en la concentración de ligando y el paso óptico. Los espectros de ICD mostrados en las figuras 89 y 90 muestran dos regiones que se corresponden con bandas que aparecen en los espectros de absorción, una relativamente intensa y negativa que se extiende por

debajo de aproximadamente 410 nm y otra mucho más débil que cubre las longitudes mayores que 410 nm y cuyo signo es ligeramente positivo muy próximo a 0. Asumiendo que el momento de transición de la banda que aparece a longitudes de onda más bajas era casi perpendicular al eje mayor del ligando, el localizado a energías más baja podría corresponder al momento de la transición que está orientado casi a lo largo del eje mayor. El signo negativo de en la señal de ICD de la banda de alta energía está de acuerdo con que sea un intercalante cuyo eje menor se encuentra paralelo al bolsillo de unión del ADN.^{176, 3, 261} Sin embargo, la casi ausencia o la banda ligeramente positiva de ICD para los picos de absorción de baja energía induce a pensar que haya un momento de la transición orientado a casi 45° del eje del bolsillo de unión formado por las bases. La ausencia de grandes señales positivas descarta la presencia de interacciones de unión al surco entre ligando y ADN.

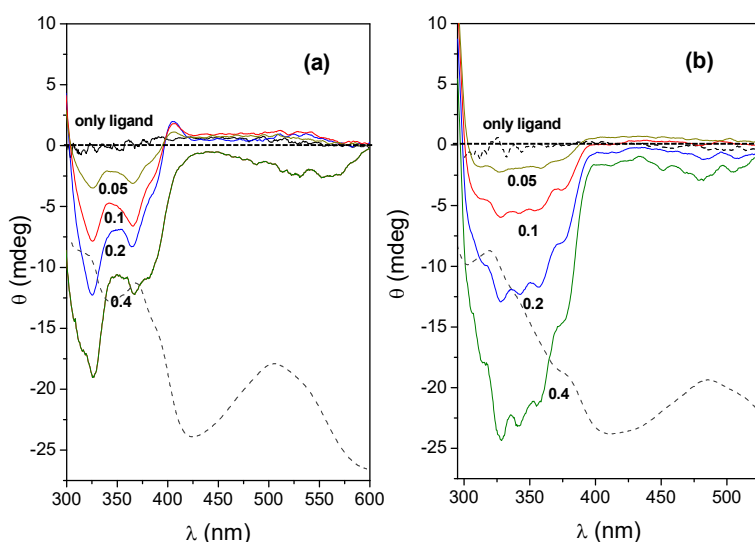


Figura 89. Elipticidad (θ) medida a 25°C para los ligandos (a) **53** y (b) **56** en una mezcla agua/DMSO al 5% en presencia de ADN ($[ADN]=1,95 \times 10^{-4}$ M y $3,0 \times 10^{-4}$ M respectivamente) a distintos ratios molares ligando/ADN. Se ha superpuesto el espectro de absorción para ambos ligandos (---) (cubetas de 1 cm de paso óptico)

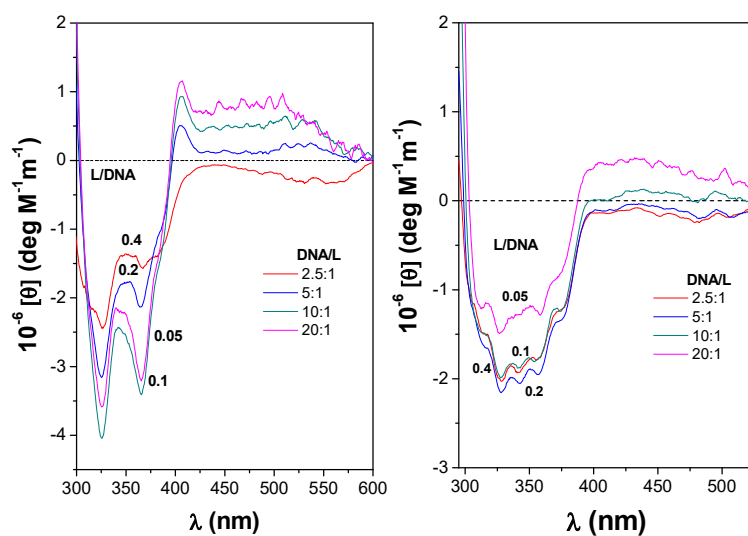


Figura 90. Elipticidades molares ($[\theta]$) medidas a 25°C para los ligandos **53** (izquierda) y **56** (derecha) en una mezcla agua/DMSO al 5% en presencia de ADN ($[\text{ADN}] = 1,95 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $3,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ respectivamente) a distintos ratios molares ligando/ADN. Las medidas fueron realizadas en cubetas de un 1 cm de paso óptico

5. Mecánica y dinámica molecular

Con el objetivo de corroborar los datos obtenidos experimentalmente y la orientación del cromóforo en el proceso de intercalación tras las medidas de dicroísmo circular, el Dr. Francisco Mendicuti, del Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la UAH, llevó a cabo los estudios de mecánica y dinámica molecular que se muestran a continuación.

5.1. Estudio de los ligandos 4 y 11

En primer lugar se llevó a cabo un estudio de mecánica molecular, para conocer la conformación del complejo de mínima energía de unión Ligando:ADN. Los valores totales de las energías de unión obtenidos en este estudio se muestran en la figura 91 junto con las contribuciones electrostáticas y de Van der Waals como función de la distancia oo' a lo largo de la coordenada y , para la orientación más favorable del ligando **11** aproximándose al ADN por los lados del surco mayor y menor. Se consideraron dos aproximaciones diferentes (Figura 91 derecha) paralela a las bases como un intercalante y paralela a la doble hélice del ADN como un ligando que se une al surco.

Aunque la aproximación del ligando como intercalante tiene lugar sin apenas barrera energética potencial, en la aproximación para dar unión al surco, se observaron elevadas barreras de energía potencial a $y = \pm 5 \text{ \AA}$ debido a interacciones repulsivas de Van der Waals del cromóforo con el par de bases de ADN cuando el compuesto **11** está orientado 45° con respecto a los pares de base. Los resultados en la mecánica molecular muestran que las interacciones electrostáticas son las principales responsables de la estabilización del sistema. Cabe resaltar que para las estructuras de mínima energía de unión (MBE) del compuesto **11**, el ligando se encuentra posicionado de tal manera que su eje principal está orientado paralelo al eje central del bolsillo TA AT pero ligeramente fuera de él, en el lado del surco mayor (panel 1 de la figura 91). Sin embargo, el eje largo principal del compuesto **11** está casi paralelo a ambas cadenas de ADN en el panel 2 de la figura 91. Las flechas en esta figura indican el grupo acenafteno en el ligando. Las conformaciones que se observan en los paneles 1 y 2 fueron usadas como los puntos de partida para los estudios de dinámica molecular.

Una vez obtenida la estructura de mínima energía de unión del complejo Ligando:ADN, esta pasa a ser el punto de partida para las simulaciones de dinámica molecular, donde se analizaron sus orientaciones y energías a lo largo de una trayectoria de 1 nanosegundo.

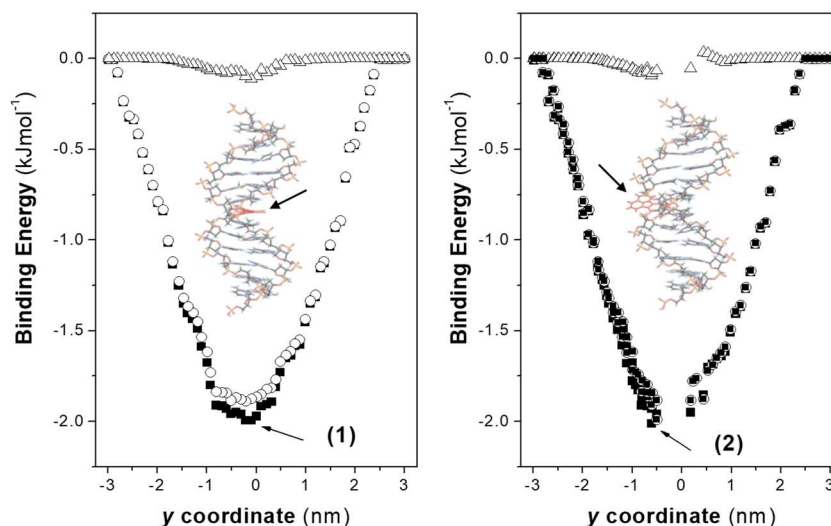


Figura 91. Energías de unión totales (■), contribuciones de Van der Waals (△) y electrostáticas (○) como función de la distancia oo' (nm) medidas a lo largo de la coordenada y para el ligando **11** aproximándose al ADN como un intercalante (izquierda) y como ligando que se une al surco (derecha). Las estructuras de mínima energía de unión se encuentran sobreimpresionadas, designadas como 1 y 2 vistas desde el eje x positivo

En los estudios de dinámica molecular, el historial de las energías de unión del complejo **11**:ADN, así como las contribuciones y las distancias obtenidas del análisis de las trayectorias en 1 ns a 300 K con solvatación en agua y la estructura de mínima energía de unión se muestran en la figura 92 (panel superior). Los resultados indican que las interacciones en el complejo **11**:ADN son favorables para que exista el fenómeno de intercalación durante toda la trayectoria. Al igual que lo que ocurre en los estudios de mecánica molecular, las contribuciones más importantes a la estabilización del sistema son las fuerzas electrostáticas. Las interacciones de Van der Waals contribuyeron un 10% a la energía total de unión (figura 92 panel superior).

El historial para la coordenada y del centro del ligando **11** (o') se muestra en la figura 92 (panel inferior). El intercalante tiende a moverse dentro del bolsillo entre los pares de bases cerca del valor -1 (Å) para la coordenada y . Este movimiento implica también rotación y el subsecuente incremento del ángulo entre el bisector del bolsillo entre las bases y el eje mayor del ligando de tal manera que después de aproximadamente 0,7 ns y al final de la trayectoria se encuentra

orientado casi de forma perpendicular al bolsillo y con el grupo acenafteno ligeramente fuera, en la cara del surco menor (figura 93). La última estructura es consistente con el signo de las bandas observado en el espectro de ICD para la región en la que el compuesto **11** es capaz de absorber (figura 70 derecha). Además, la media de los ángulos entre el plano del bolsillo formado por AT y TA y el plano del intercalante **11** a lo largo de toda la trayectoria es casi 0, como se podía esperar.

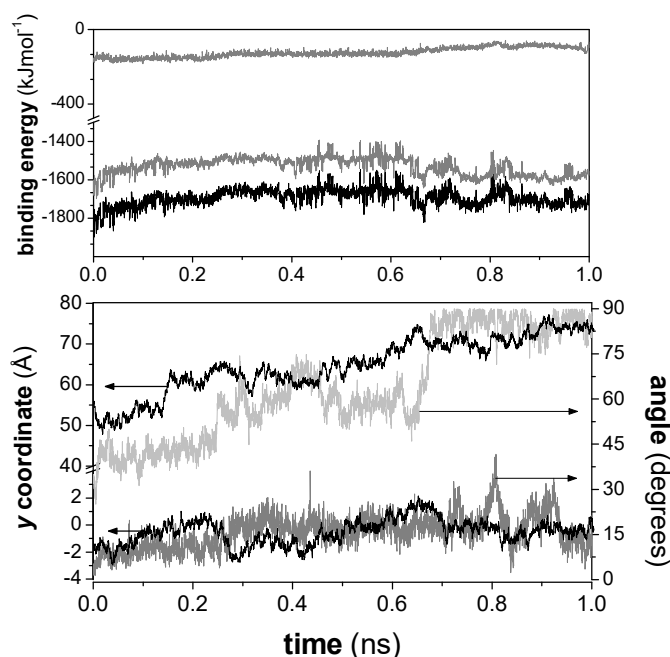


Figura 92. (Panel superior) Historial de las de las energías de unión (negro) y de las contribuciones electrostáticas (gris) y de Van der Waals (gris claro) obtenidas del análisis de las trayectorias en 1 ns en dinámica molecular a 300 K empezando desde la estructura de mínima energía de unión. (Panel inferior) Historial del desplazamiento del centro del ligando **11** (σ') por la coordenada y (línea negra inferior), la distancia de extremo a extremo de la doble hélice de ADN (línea negra superior), el ángulo medio entre los planos de ambos pares de base AT y TA y el plano del ligando **11** (gris oscuro) y el ángulo entre el bisector del bolsillo y el eje mayor del ligando **11** (gris claro)

Otra observación característica después de la intercalación es que, con el tiempo, se produce un incremento monótonico de la distancia de una punta a otra de la doble hebra de ADN (figura 92). Este cambio es debido a un ligero desenrollamiento y elongación de la biomolécula tras la intercalación. El alargamiento de la doble hélice, así como las interacciones base-ligando, son consistentes con el aumento de la intensidad de las bandas observadas en el

espectro de CD en la región en la que absorbe el ADN tras la formación del complejo **11**:ADN (figura 69). Los detalles de algunas capturas de pantalla de las estructuras de los complejos a distintos tiempos se muestran en la figura 93.

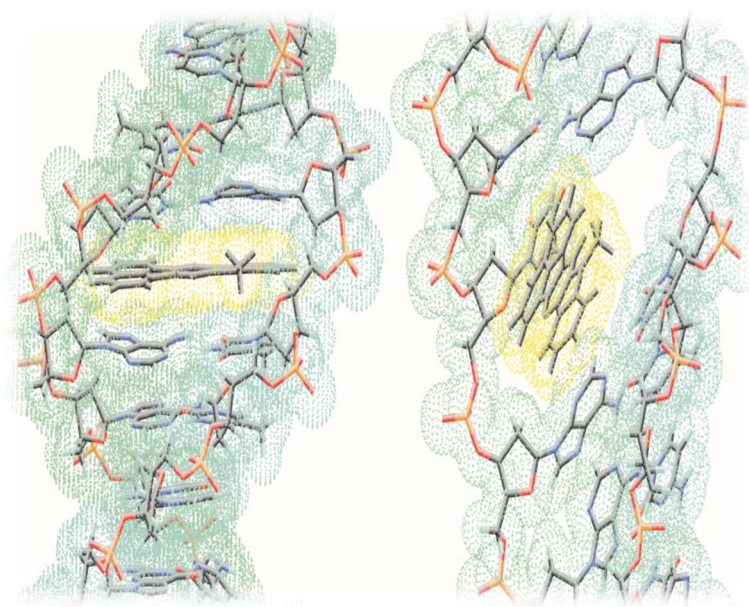


Figura 93. Capturas de pantalla de la trayectoria de dinámica molecular a 300 k mostrando la posición del ligando. Las estructuras corresponden a la parte central del complejo **11**:ADN. (Izquierda) A tiempo = 0 ns, la estructura de mínima energía de unión. (Derecha) A tiempo = 0,8 ns desde el inicio de la trayectoria

Cuando se realizó la dinámica molecular empezando desde la estructura de mínima energía de unión para la aproximación hacia el surco, la característica más recalable es que, durante los primeros pasos de la trayectoria, el ligando penetra y prefiere intercalar entre dos pares de base AT-TA. Mientras que el plano de la molécula **11** está casi paralelo al plano formado por el par de bases, en este caso el ángulo entre el eje mayor del ligando y el bolsillo de unión es de unos 45° y al final de la trayectoria disminuye a cerca de 30° , lo cual no es consistente con los datos experimentales (figura 94) y puede ser atribuido a efectos estereoelectrónicos inesperados en la molécula estudiada.

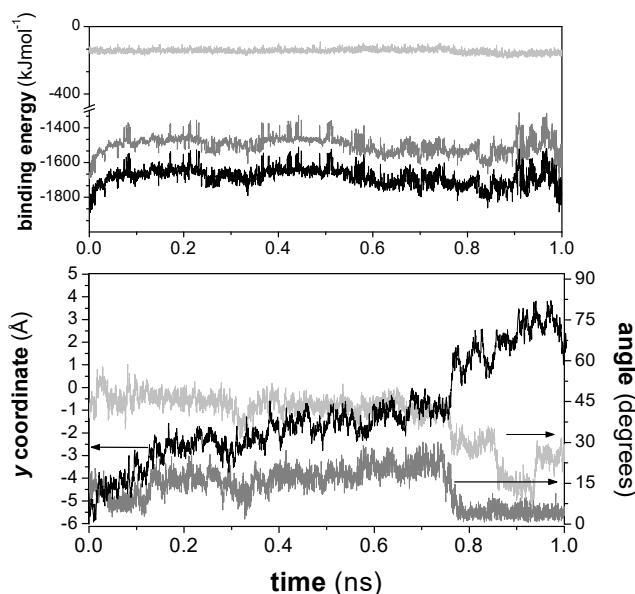


Figura 94. (Panel superior) Historial de las energías de unión (negro) y de las contribuciones electrostáticas (gris) y de Van der Waals (gris claro) obtenidas del análisis de la trayectoria de 1 ns en dinámica molecular a 300 K empezando desde la estructura de mínima energía de unión del complejo **11**-ADN con unión al surco obtenido de los cálculos de mecánica molecular. (Panel inferior) Historial del desplazamiento para el centro del ligando **11** (σ') por la coordenada y (línea negra inferior), la media de los ángulos entre el plano formado por los pares de base AT y el plano del ligando **11** (gris oscuro) y el ángulo entre el bisector de las bases del bolsillo y el eje mayor del cromóforo **11** (gris claro)

Una situación similar ocurre en el estudio de mecánica molecular para la complejación del ADN con el ligando **4**. Como se muestra en la figura 95, la intercalación del compuesto **4** es favorable siendo las interacciones electrostáticas las principales responsables de la estabilización del complejo. Los resultados para la estructura de mínima energía de unión indican que el compuesto **4** se encuentra principalmente orientado de forma paralela a los pares de bases cuando intercala la molécula de ADN, pero que prefiere estar localizado ligeramente fuera del bolsillo de unión hacia la cara del surco menor. El análisis de las trayectorias en los estudios de dinámica molecular también mostró que las interacciones en la intercalación son favorables durante toda la trayectoria, siendo las de tipo electrostático las contribuciones más importantes para la estabilización (figura 96).

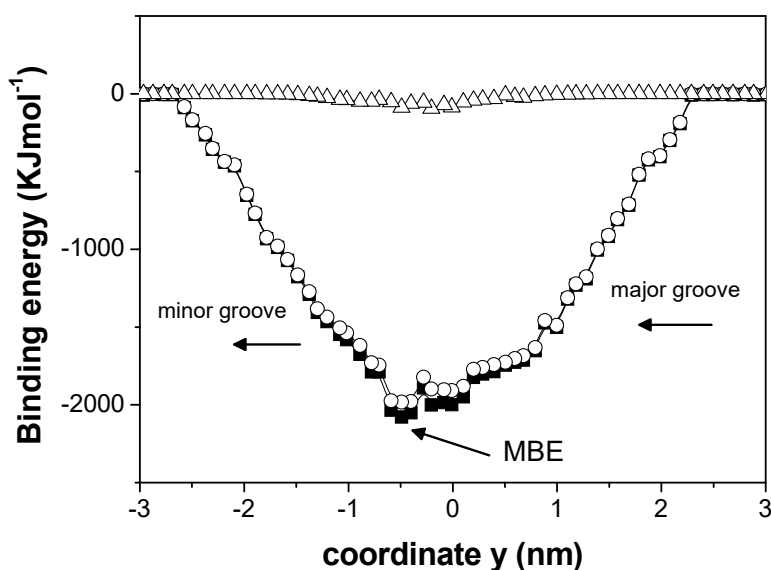


Figura 95. Energía de unión total (\blacksquare), contribuciones electrostáticas (\circ) y de Van der Waals (Δ) como función de la distancia oo' (nm) medida a lo largo de la coordenada y para el ligando **4** aproximándose al ADN como intercalante. La estructura de mínima energía de unión fue usada como punto de partida para las simulaciones de dinámica molecular

En este caso, el centro del intercalante tiende a estar cerca de la coordenada $y = +1$ (\AA). La media de los ángulos entre el bisector del bolsillo de bases y el eje mayor de la sonda es de $62,1 \pm 9,8^\circ$, lo que indica que se desvía ligeramente de 90° . Este comportamiento es el responsable de las señales débiles de ICD. Además, el ángulo entre los pares de base AT y TA y el plano del intercalante **4** es casi cero, como se podría esperar. Por último, resaltar que, al igual que en el estudio previo, existe un incremento monotónico de la distancia de punta a punta del ADN que ocurre con el tiempo.

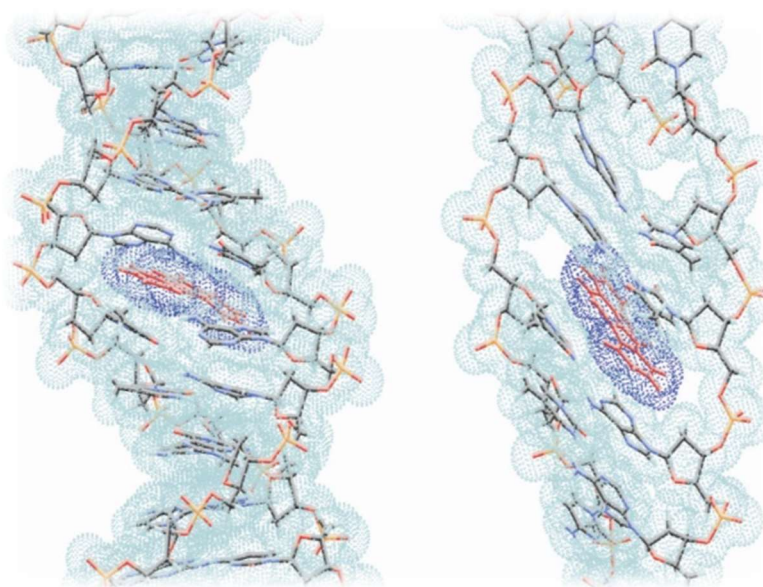


Figura 96. Fragmentos de las estructuras de mínima energía para el complejo **4**-ADN usado como conformación de partida para las trayectorias de 1 ns en dinámica molecular a 300 K (izquierda) y los obtenidos del análisis de las trayectorias de dinámica molecular (derecha)

5.2. Estudio de los ligandos **40** y **41**

En este caso, también se siguió la misma estrategia empleada en los apartados anteriores para estas simulaciones. El primer paso en la realización de estos estudios fue hallar, mediante mecánica molecular, la conformación de mínima energía de unión del complejo Ligando:ADN. Tras la realización de las simulaciones de mecánica molecular se obtuvieron las gráficas expuestas en la figura 97, donde se encuentra expresada para los ligandos **40** y **41** la energía de unión junto con las contribuciones de la energía de Van der Waals y la energía electrostática. La intercalación tiene lugar sin una barrera energética significativa. En esta figura, en la que se puede apreciar que la estabilización del complejo se debe en gran medida a las interacciones electrostáticas, también se muestran las estructuras de unión de los complejos **40**:DNA y **41**:DNA con mínima energía de unión (MBE) obtenidas mediante estas simulaciones de mecánica molecular. El compuesto **41** intercala de tal manera que su eje principal está orientado 45° a la base central del bolsillo de unión TA-AT y ligeramente fuera, hacia la cara del surco mayor. En el caso del compuesto **40**, su eje principal se encuentra

orientado casi de forma paralela al eje que forman las bases en el bolsillo de unión y ligeramente fuera hacia la cara del surco menor.

Una vez obtenidas las estructuras de mínima energía de unión de los complejos Ligando:ADN mediante mecánica molecular se procedió a realizar simulaciones de dinámica molecular utilizando la conformación previamente obtenida como punto inicial en las trayectorias a estudiar. El análisis de las trayectorias de ambos ligandos en 1,0 ns en dinámica molecular a 300 K para el complejo optimizado de mínima energía de unión y solvatado con agua, mostró que las interacciones Ligando:DNA son favorables para ambas intercalaciones a lo largo de toda la trayectoria (figura 98). Y como en los estudios de mecánica molecular, la mayor contribución a la estabilización del complejo la aportaban las interacciones electrostáticas. La contribución de la energía de Van der Waals representa apenas un 10% del total de la energía de unión.

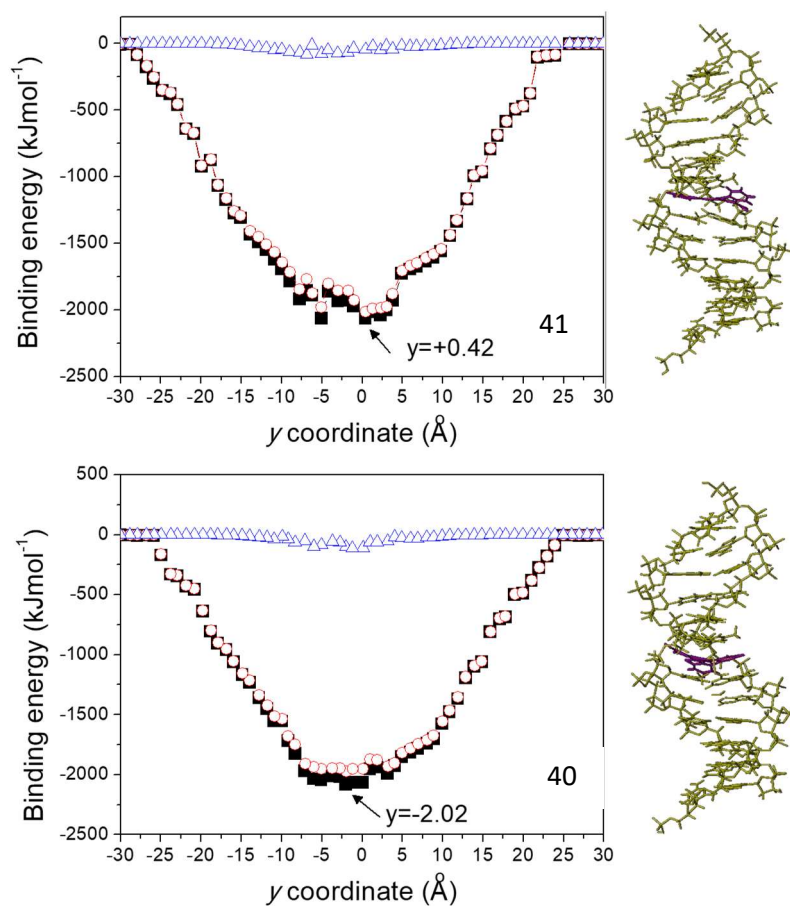


Figura 97. Energías totales de unión (\square) y las contribuciones de electrostáticas (\circ) y de Van der Waals (Δ) como función de la distancia medida a lo largo del eje y para los ligandos **41** y **40** aproximándose al ADN como intercalantes. Las estructuras de unión del complejo de mínima energía (MBE) para **41** y **40** representadas fueron minimizadas una vez más y fueron usadas como las conformaciones iniciales para las dinámicas moleculares

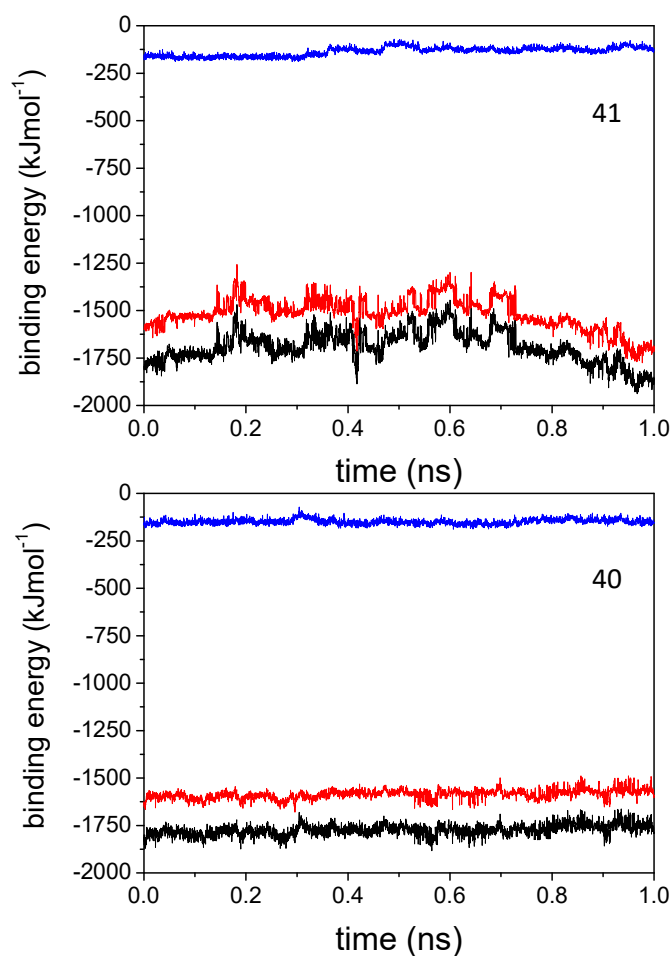


Figura 98. Histograma de las energías de unión (negro) y las contribuciones electrostáticas (rojo) y de Van der Waals (azul) obtenidas para el análisis de un 1 ns en dinámica molecular a 300 K empezando desde la estructura del complejo de mínima energía MBE para el complejo **41**:ADN y **40**:ADN obtenidos de la mecánica molecular

La estructura del complejo de mínima energía de unión a tiempo cero y al final de la trayectoria para el complejo **41**:ADN se muestra en la figura 99. El intercalante **41** tiende a moverse a tiempos cercanos a cero dentro del bolsillo del par de bases cerca de la coordenada $y = 0$ y se encuentra ligeramente fuera, orientado hacia el surco mayor. En el caso del ligando **40**, este se mueve de manera similar, sin embargo, se encuentra ligeramente fuera del bolsillo

hacia el surco menor. La media de las coordenadas y para las trayectorias en la dinámica molecular para **40** y **41** fueron de $2,3 \pm 0,9$ y $0,9 \pm 2,0$ Å respectivamente. En este movimiento se pudo apreciar alguna rotación en el caso del compuesto **41** y un subsecuente aumento del ángulo entre el eje del bolsillo de unión y el eje mayor de este cromóforo. De hecho, después de 0,45 ns el ligando **41** estaba orientado casi perpendicularmente al bolsillo con el grupo fenantreno ligeramente fuera del mismo hacia el surco mayor, mientras que hacia el final de la trayectoria el ángulo formado disminuía ligeramente. La media de los ángulos formados entre el eje mayor del bolsillo de unión y el eje mayor del ligando fue de $64 \pm 20^\circ$ lo cual es consistente con el signo negativo de la señal de la banda de alta energía en las medidas de dicroísmo circular cuyo momento de transición se asumió como casi perpendicular al eje mayor de **41**. Para el cromóforo **40**, la media de los ángulos formados entre el eje mayor del bolsillo de unión y el eje mayor de la molécula fue de $8 \pm 5^\circ$, lo cual no reproduce ni las bandas ni la intensidad de las señales obtenidos para el espectro de ICD de las disoluciones de **40**:ADN.

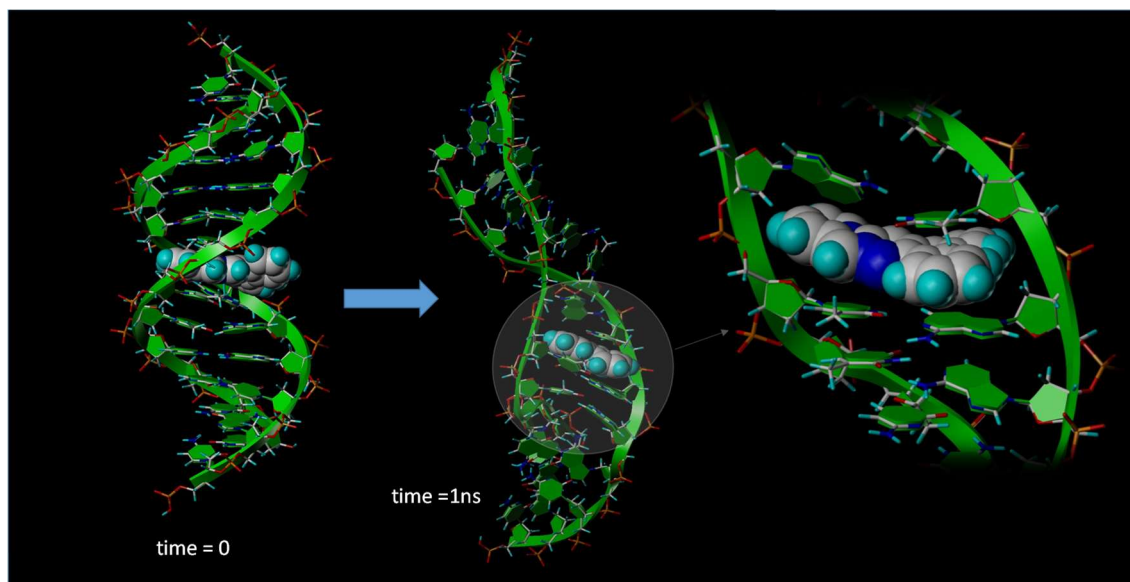


Figura 99. Capturas de la dinámica molecular de 1 ns a 300 K mostrando la localización del ligando **41** a tiempo = 0 ns y a 1 ns desde el inicio de la trayectoria. Detalles de la localización del compuesto **41** al final de la trayectoria de 1 ns (derecha)

Los ángulos entre los planos formados por pares de bases AT-TA y el eje mayor de los cromóforos **40** y **41** estuvo muy próximo a cero (medias de $11 \pm 7^\circ$ y $12 \pm 6^\circ$ respectivamente), lo cual es esperable al tratarse de intercalantes. Otra característica propia de la intercalación es

la distorsión de la doble hélice de ADN y un ligero desenrollamiento y alargamiento de las cadenas de ADN. De hecho, si la distancia inicial entre nucleótidos de principio a fin de la cadena era de 4,1 Å, después de la intercalación aumentó a $5,8 \pm 0,5$ Å para el complejo **41**:ADN y $4,9 \pm 0,3$ Å para **40**:ADN.

Para el compuesto **40**, se realizó además una dinámica molecular más larga de 3 ns. El análisis de esta mostró como la media de los ángulos formados por el eje mayor del bolsillo de unión y el eje longitudinal de **40** aumentó con el tiempo hasta alcanzar en el último nanosegundo valores de $40 \pm 9,0^\circ$. Las estructuras del complejo **40**:ADN al final de los 3 ns de dinámica molecular se muestran en la figura 100.

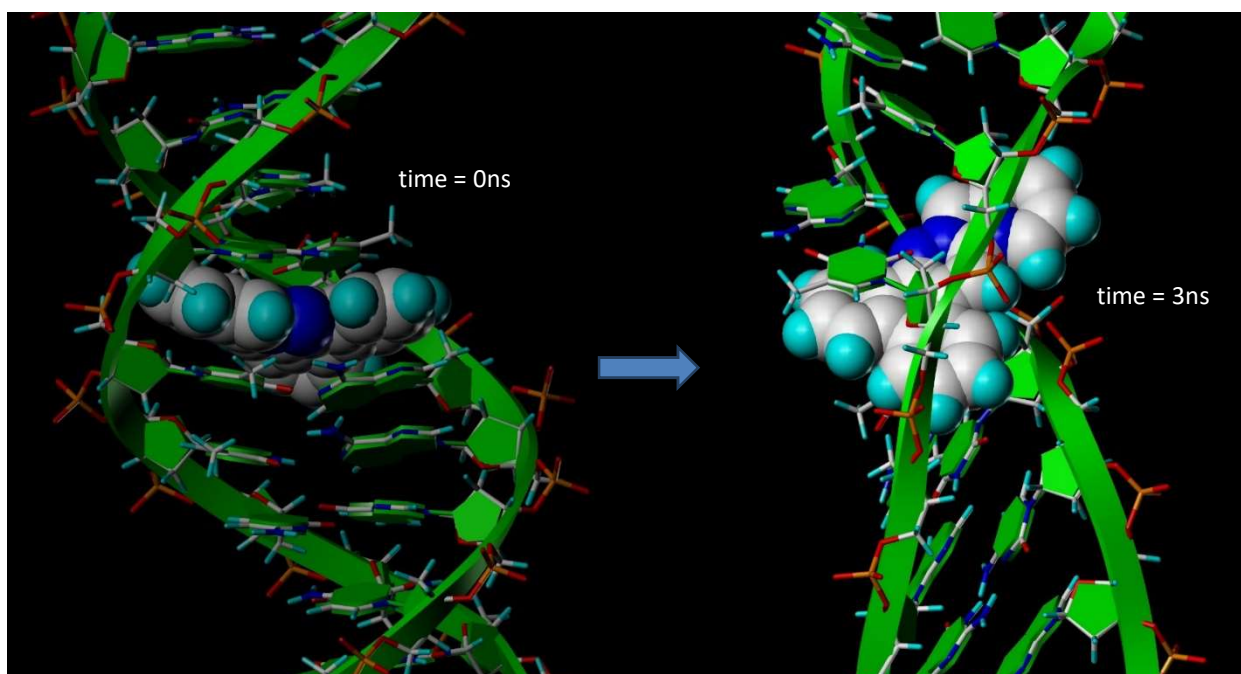


Figura 100. Detalle de la localización del ligando **40** al principio y al final de la trayectoria de la dinámica molecular de 3 ns para el complejo **40**:ADN

En resumen, del análisis de las energías resultantes en los estudios de mecánica molecular, se puede afirmar que la más importante contribución a la estabilización del complejo Ligando:ADN la aportan las interacciones electrostáticas. En las simulaciones de mecánica molecular, se pudo observar que, para el complejo **41**:ADN, el ligando se hallaba orientado fuera del bolsillo de unión hacia el surco mayor al final de la trayectoria. Este comportamiento es similar al presentado por el complejo **40**:ADN, si bien la orientación en este caso es hacia el surco menor. En el análisis de los ángulos que forman los ejes mayores de los cromóforos con el eje mayor del par de bases se observó que para el ligando **41**, se obtiene un ángulo de $64 \pm 20^\circ$, consistente con la banda negativa observada en ICD, mientras que para el ligando **40** se aprecia al final de la trayectoria de 1 ns un ángulo de $8 \pm 5^\circ$ valor que no concuerda con lo esperado tras el análisis de los espectros de ICD. En el análisis de una trayectoria de 3 ns para el ligando **40**, por el contrario, se obtuvo un valor del ángulo entre ambos ejes mayores (ligando y pares de base) de $40 \pm 9^\circ$, lo cual se acerca más a lo obtenido en los espectros de ICD. Por último, es interesante resaltar que los ángulos diedros formados entre los planos formados por los pares de base y el plano del compuesto tienden a 0, hecho habitual para los compuestos intercalantes de ADN.

5.3. Estudio de los ligandos **53** y **56**²⁴⁹

Siguiendo con el análisis de los cromóforos **53** y **56**, se realizan los estudios de mecánica molecular para conocer la conformación del complejo de mínima energía de unión. De estas simulaciones se obtuvieron las figuras 101 y 102 donde se observan las energías de unión totales, así como las contribuciones electrostáticas y de Van der Waals tras la intercalación de estos ligandos en el fragmento de ADN entre los pares de base centrales AT-TA. La intercalación de estos ligandos tuvo lugar por el surco mayor con su eje mayor paralelo (Figura 101) o perpendicular (Figura 102) al bolsillo formado por los pares de base. Esta tuvo lugar sin ninguna barrera de potencial significativa cuando el ligando se aproximó con su eje mayor paralelo al bolsillo formado por los pares de base (Figura 101). Sin embargo, en la aproximación perpendicular se observaron barreras energéticas en las coordenadas y positivas (Figura 102) que indicarían que con esta orientación el ligando preferiría una aproximación desde el surco menor (aparentemente sin ninguna barrera). En ambos casos las interacciones electrostáticas fueron las principales responsables de la estabilización. Las estructuras obtenidas de mínima energía de unión para ambos complejos con DNA se muestran en las mismas figuras y sirvieron de punto inicial para las simulaciones de dinámica molecular. La

orientación de los ligandos en relación con el eje del bolsillo formado por los pares de base, cambiaron muy poco desde la estructura inicial durante la aproximación.

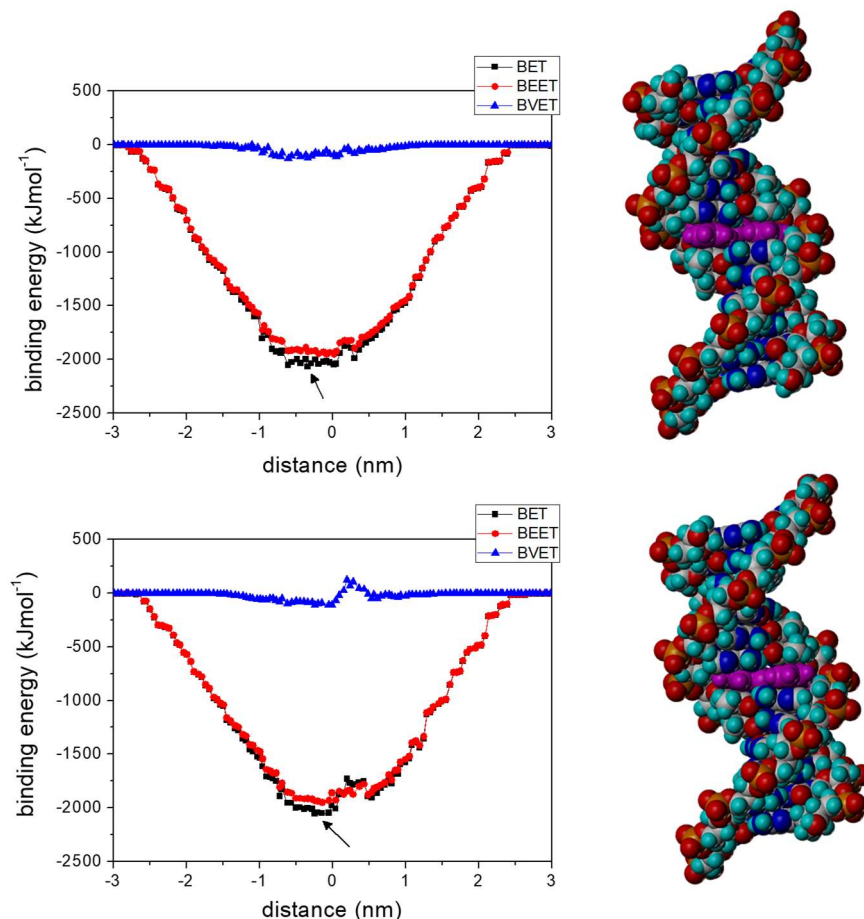


Figura 101. Energías de unión totales (■), y contribuciones de Van der Waals (▲) y electrostáticas (●) como función de la distancia oo' medida a lo largo de la coordenada y para el ligando **53** (arriba) y **56** (abajo) acercándose al ADN como intercalantes con su eje mayor paralelo al bolsillo formado por los pares de base AT-TA. Se encuentran representadas las estructuras de mínima energía de unión (señaladas por las flechas) para ambos ligandos, una vez minimizadas de nuevo se usaron como las conformaciones iniciales en las simulaciones de dinámica molecular

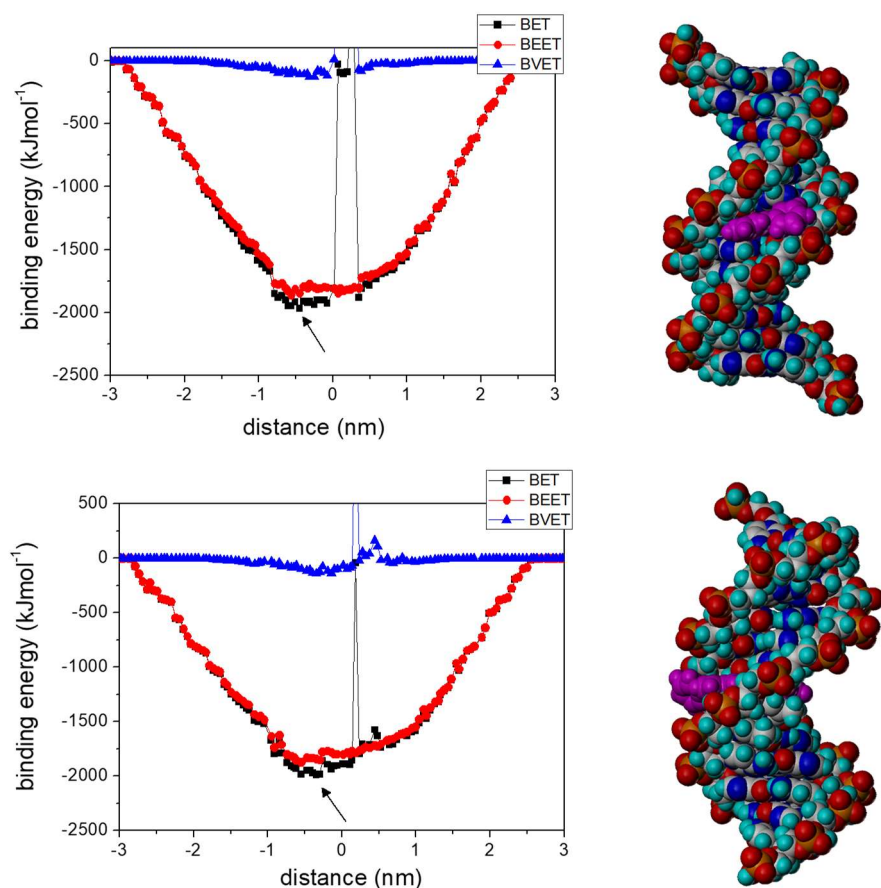


Figura 102. Energías de unión totales (■), y contribuciones de Van der Waals (▲) y electrostáticas (●) como función de la distancia oo' medida a lo largo de la coordenada y para el ligando **53** (arriba) y **56** (abajo) acercándose al ADN como intercalantes con su eje mayor perpendicular al bolsillo formado por los pares de base AT-TA. Se encuentran representadas las estructuras de mínima energía de unión (señaladas por las flechas) para ambos ligandos, una vez minimizadas de nuevo se usaron como las conformaciones iniciales en las simulaciones de dinámica molecular

Una vez obtenida la conformación del complejo de mínima energía de unión se procedió a los estudios de dinámica molecular. Los paneles izquierdos de la figura 103 y 104 muestran los valores para las energías de unión y contribuciones electrostáticas y de Van der Waals para los complejos **53**:DNA y **56**:DNA obtenidas del análisis de las trayectorias de 1,0 ns a 300 K con solvatación de agua para las estructuras de mínima energía de unión (Figuras 101 y Figura 102). Los resultados mostraron que las interacciones ligando-ADN son favorables durante toda la trayectoria para las intercalaciones. Como se observa en la mecánica molecular, las contribuciones más importantes para la estabilización son las interacciones electrostáticas. Las interacciones de Van der Waals contribuyen un 10% a la energía total de unión. La tabla 11 contiene las medias de varios parámetros energéticos y geométricos obtenidos del análisis de las trayectorias por dinámica molecular.

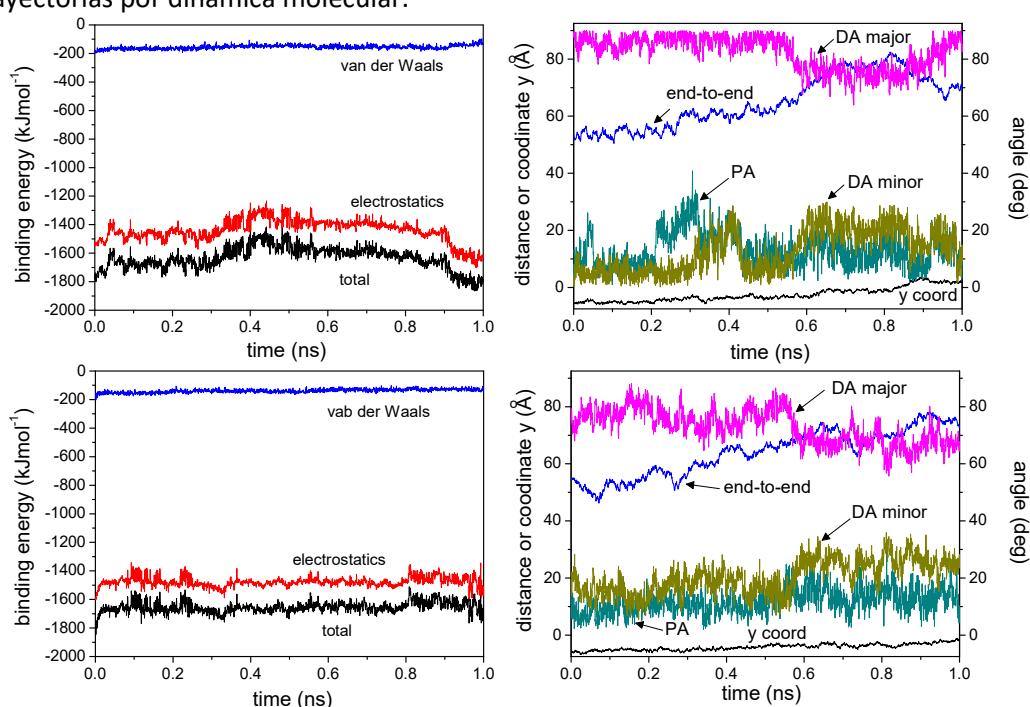


Figura 103. (Paneles izquierdos) Histogramas para las energías de unión y las contribuciones de Van der Waals y electrostáticas; (paneles derechos) histogramas de la coordenada y del centro del ligando para la distancia de extremo a extremo del fragmento de ADN de 12 nucleótidos (end-to-end), para las medias de los ángulos entre el plano formado por los pares AT-TA y el plano formado por los anillos del ligando (PA) y los ángulos entre el eje del bolsillo formado por los pares de base y el eje mayor (DA mayor) o el eje menor (DA menor) del ligando obtenido del análisis de 1 ns de trayectoria en dinámica molecular a 300 K partiendo de la estructura de mínima energía de unión de los complejos **53**:ADN (paneles superiores) y **56**:ADN (paneles inferiores) por aproximación del ligando con su eje mayor **perpendicular** al bolsillo de unión

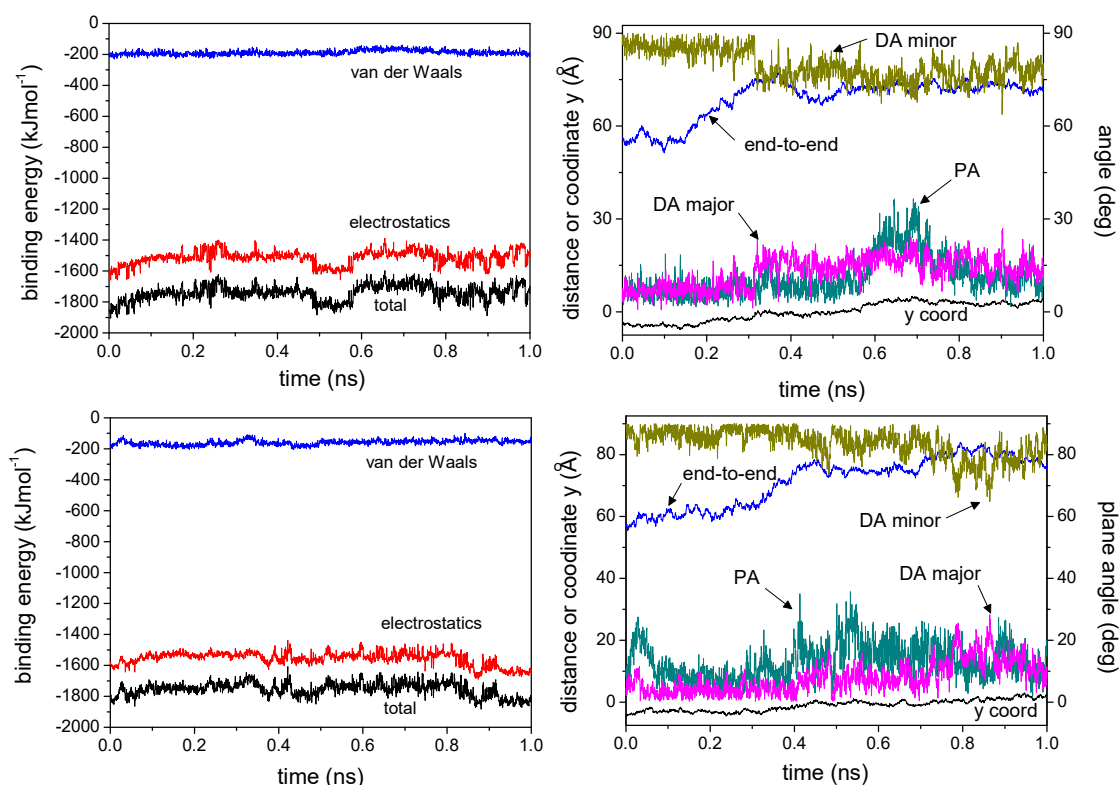


Figura 104. (Paneles izquierdos) Histogramas para las energías de unión y las contribuciones de Van der Waals y electrostáticas; (paneles derechos) histogramas de la coordenada y del centro del ligando para la distancia de extremo a extremo del fragmento de ADN de 12 nucleótidos (end-to-end), para las medias de los ángulos entre el plano formado por los pares AT-TA y el plano formado por los anillos del ligando (PA) y los ángulos entre el eje del bolsillo formado por los pares de base y el eje mayor (DA mayor) o el eje menor (DA menor) del ligando obtenido del análisis de 1 ns de trayectoria en dinámica molecular a 300 K partiendo de la estructura de mínima energía de unión de los complejos **53**:ADN (paneles superiores) y **56**:ADN (paneles inferiores) por aproximación del ligando con su eje mayor paralelo al bolsillo de unión

Los valores para la coordenada y del centro de los ligandos **53** y **56** se muestran en los paneles derechos de la figura 103 y la figura 104 para los complejos **53**:ADN y **56**:ADN aproximando el ligando al ADN con su eje mayor perpendicular o paralelo al bolsillo formado por los pares de base. El intercalante tiende a mantenerse cerca de la coordenada $y = 0$ ligeramente fuera en la cara del surco mayor o menor. Las medias de estas coordenadas a lo largo de las trayectorias de dinámica molecular fueron de $-2,5 \pm 2,5$ y $-4,2 \pm 1,1$ Å para los complejos **53**:ADN y **56**:ADN respectivamente en aproximación perpendicular del ligando; mientras que las medias para los

complejos **53:ADN** y **56:ADN** en aproximación paralela de los ligandos fueron de $0,1 \pm 3,0$ y $-1,1 \pm 1,8$ Å respectivamente. Como se observa en las figuras 103 y 104 las dinámicas moleculares de 1 ns no cambiaron sustancialmente las orientaciones relativas iniciales del ligando con respecto al eje del bolsillo de unión formado por los pares de base. La tabla 11 contiene las medias de los ángulos entre el eje mayor y menor del ligando y el eje del bolsillo formado por los pares de base durante trayectorias de 1 ns para ambos tipos de aproximación. Por ejemplo, para la aproximación perpendicular de los ligandos al bolsillo formado por los pares de base, la media el ángulo entre el eje menor (mayor) y el eje del bolsillo formado por los pares de base fueron de $12,6 \pm 7,4^\circ$ y $20,4 \pm 5,8^\circ$ ($82,2 \pm 5,8^\circ$ y $72,9 \pm 5,9^\circ$) para los complejos **53:ADN** y **56:ADN** respectivamente.

Tabla 11. Media de algunos parámetros energéticos y geométricos obtenidos del análisis de 1 ns de las trayectorias de dinámica molecular para los complejos **53:ADN** y **56:ADN** por aproximación de los ligandos con su eje mayor paralelo (||) o perpendicular (⊥) al eje del bolsillo formado por los pares de base

Parámetros	53 ()	53 (⊥)	56 ()	56 (⊥)
$E_{\text{total unión}}$ (kJmol ⁻¹)	$-1741,3 \pm 52,2$	$-1633,4 \pm 79,5$	$-1754,8 \pm 44,5$	$-1654,7 \pm 38,5$
$E_{\text{unión}}$	$-1514,6 \pm 46,4$	$-1439,7 \pm 77,8$	$-1555,7 \pm 42,3$	$-1477,1 \pm 33,9$
$E_{\text{vW unión}}$	$-188,6 \pm 15,4$	$-155,5 \pm 13,9$	$-160,4 \pm 16,7$	$-139,1 \pm 13,0$
γ (Å)	$+0,1 \pm 3,0$	$-2,5 \pm 2,5$	$-1,1 \pm 1,8$	$-4,2 \pm 1,1$
distancia (Å)	$3,8 \pm 1,0$	$4,2 \pm 0,9$	$2,1 \pm 1,1$	$4,7 \pm 1,2$
Distancia de extremo a extremo (Å)	$68,9 \pm 6,6$	$65,2 \pm 9,2$	$71,6 \pm 7,9$	$63,9 \pm 8,1$
Angulo diedro (°)	$11,2 \pm 6,5$	$13,2 \pm 5,9$	$12,9 \pm 7,9$	$11,9 \pm 4,3$
Angulo con el eje mayor (°)	$12,9 \pm 4,9$	$82,2 \pm 5,8$	$7,8 \pm 5,1$	$72,9 \pm 5,9$
Angulo con el eje menor (°)	$79,5 \pm 5,0$	$12,6 \pm 7,4$	$83,6 \pm 4,8$	$20,4 \pm 5,8$

Estos resultados concuerdan razonablemente con la banda negativa de alta energía ($\lambda \leq 410$ nm) en el espectro de dicroísmo circular, cuyo momento de la transición se encuentra orientado a lo largo del eje menor del ligando que está casi paralelo al eje del bolsillo formado por los pares de

base. La banda positiva de baja energía (cercana a 0) a $\lambda \geq 410$ nm concordaría con el ángulo entre el eje mayor del ligando y el eje del bolsillo formado por los pares de base que sería de 45° o mayor. De esta manera las estructuras para los complejos de **53:ADN** y **56:ADN** cuando los ligandos se aproximan de manera perpendicular al bolsillo en el ADN al principio, durante o al final de la trayectoria de dinámica molecular concuerdan bastante con el signo observado en los espectros de ICD.

Como ejemplo la figura 105 muestra la estructura de mínima energía de unión a tiempo = 0 ns y al final de la trayectoria para el complejo **56:ADN**. En la última estructura se observa al ligando 10 orientado con su eje menor casi paralelo al eje del bolsillo con el grupo fenantreno dentro del bolsillo y el resto de la estructura ligeramente fuera en la cara del surco menor. Además, como se podría esperar para ligandos intercalantes, el ángulo entre los pares de base AT y TA y el plano de ambos ligandos fue casi 0. Otra característica tras la intercalación es que la doble hélice de ADN presenta un ligero desenrollamiento, distorsión y alargamiento. La distancia entre los extremos del fragmento inicial de ADN, aumentaron significativamente con el tiempo, para los complejos estudiados (figura 103 y 104). Las medias de estas distancias se encuentran en la tabla 11.

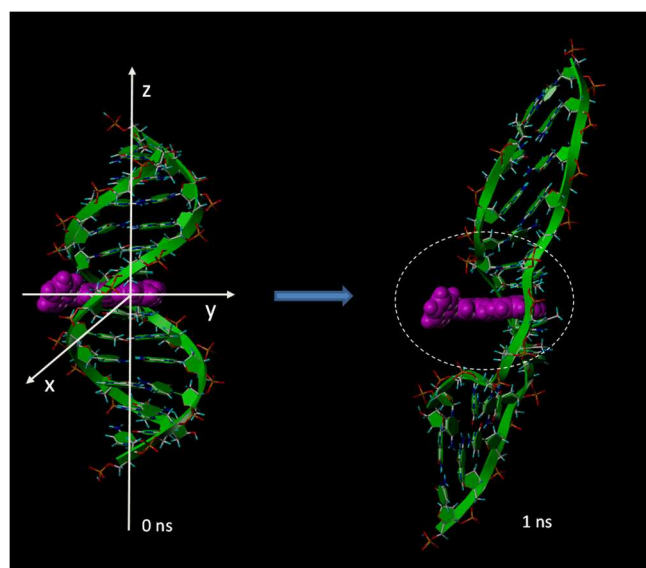


Figura 105. Captura de pantalla de trayectoria de 1ns en dinámica molecular a 300 K para el complejo **56:ADN**. La figura muestra la localización del ligando a tiempo = 0 ns (estructura de mínima energía de unión donde el eje mayor del ligando está orientado perpendicularmente al eje del bolsillo de unión formado por los pares de base) y a tiempo = 1 ns desde el inicio de la trayectoria (derecha)

6. Estudios en células vivas

Como parte del estudio de las propiedades de los cationes sintetizados también se determinó su potencial actividad antiproliferativa. Para ello, se realizaron estudios de citotoxicidad basados en el ensayo estándar de MTT en células HeLa, y de esta manera, observar el grado de inhibición en la proliferación celular.

Por otro lado, mediante observación por microscopía confocal de cultivos de células HeLa incubados con los cromóforos sintetizados, se trató de determinar cuáles de ellos presentan cualidades potenciales para una posible aplicación en tinción celular y, en ese caso, el patrón de tinción de los mismos.

6.1. Actividad antiproliferativa: ensayo de MTT

La toxicidad de todos los compuestos en cultivos celulares fue determinada por un ensayo estándar de MTT²⁶⁴ usando células HeLa. Los datos se recogieron después de 24 y 48 h de exposición. Estos experimentos se llevaron a cabo por triplicado para obtener la media de la dosis letal 50% (LD₅₀). En estos ensayos los compuestos **14**, **25** y **35** mostraron una escasa citotoxicidad con dosis letal 50 cercanas a valores del orden de 10⁻⁴ M o incluso mayores como en el caso del compuesto **37**. Los compuestos **13** y **26** mostraron valores de DL₅₀ de alrededor a 10⁻⁵ y los compuestos **23**, **36** y **39** mostraron valores ligeramente inferiores. Cabe destacar que los compuestos **31** y **34** son los compuestos con una mayor citotoxicidad en esta serie con valores algo superiores a 10⁻⁶ M. Los compuestos **32**, **33** y **38** no fueron solubles en la mezcla de DMSO y medio de cultivo DMEM y por tanto no pudieron ser analizados.

Para los compuestos **40** y **41** la dosis letal 50% (LD₅₀) fue en ambos casos cercana a 1,0 x 10⁻⁵ M como se observa en la figura 106, un valor que descarta a estos compuestos como un potencial antiproliferativo pero que unido a unos notables rendimientos cuánticos les hace ser compuestos de interés como sondas fluorescentes para tinción celular.

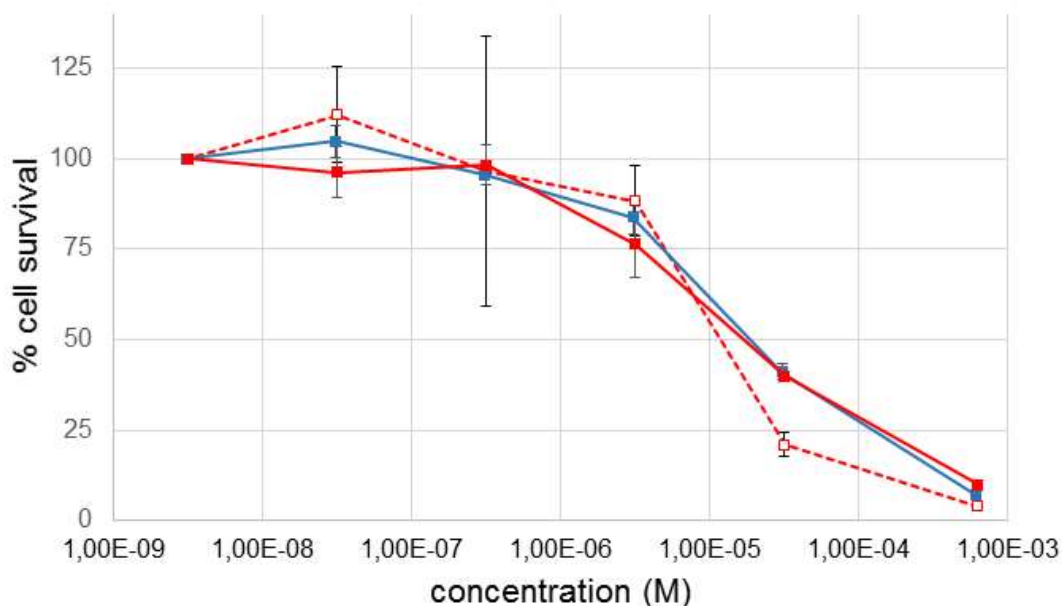


Figura 106. Perfil de citotoxicidad para células HeLa (representación del porcentaje de viabilidad celular en función de la concentración de ligando). Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del compuesto **41** (línea azul, después de 24h de incubación) y **40** (línea roja sólida después de 24h de incubación y punteada después de 48h de incubación)

Para los compuestos **50**, **52**, **56** y **57** la dosis letal 50 (LD_{50}) fue de $2,2 \times 10^{-4}$ M para los compuestos **50** y **52**, de $1,5 \times 10^{-5}$ M para el compuesto **56** y de $2,3 \times 10^{-5}$ M para el compuesto **57**.

6.2. Tinción celular. Microscopía confocal

Este estudio no se pudo realizar para los compuestos **31**, **32** y **38** debido a su total insolubilidad en los medios de cultivo. Los compuestos **23** y **26** precipitan masivamente al entrar en contacto con el medio reduciendo de esta manera su concentración efectiva, de modo que sus resultados no son comparables con los del resto de compuestos.

En los compuestos restantes, se pudo constatar una rápida internalización y acumulación intracelular, visible claramente tras dos horas de exposición al compuesto. En cuanto a la localización de los compuestos en el interior celular, puede observarse que la fluorescencia aumenta mucho o se restringe totalmente a regiones muy definidas del citoplasma, mostrando

patrones característicos que sugieren una acumulación en orgánulos específicos. No se han realizado experimentos de colocalización con marcadores fluorescentes de orgánulos, de modo que la localización sugerida en cada caso se basa en la morfología y distribución intracelular de las regiones donde parece acumularse el compuesto.

Cabe destacar que todos los compuestos muestran una fluorescencia brillante, intensa y con una considerable diversidad cromática, por encima de lo esperable extrapolando los datos obtenidos por fluorimetría. Esto podría deberse al evidente efecto de concentración localizada del compuesto que realizan las células vivas por un mecanismo aparentemente activo.

Otra observación general y relevante es que la fluorescencia está excluida del interior del núcleo en todos los compuestos estudiados, salvo una pequeña acumulación central en el caso del compuesto **34** o más difusa en el compuesto **39**. Esto contrasta con la capacidad de unión a ADN *in vitro* que se ha observado para todos los compuestos y puede ser el resultado de una desactivación total de la fluorescencia del compuesto dentro del núcleo o bien, que el mecanismo endocítico de internalización haya confinado a los compuestos en vesículas y se impida de esta manera su paso al núcleo. Es importante remarcar que, para entrar dentro de la célula o el núcleo celular, estos cromóforos han de atravesar una membrana biológica. Estos compuestos tienen tamaños relativamente grandes y están cargados, por lo que la difusión pasiva a través de membranas quedaría descartada, de modo que se requiere un transporte activo o una rotura de membranas (Figura 107).

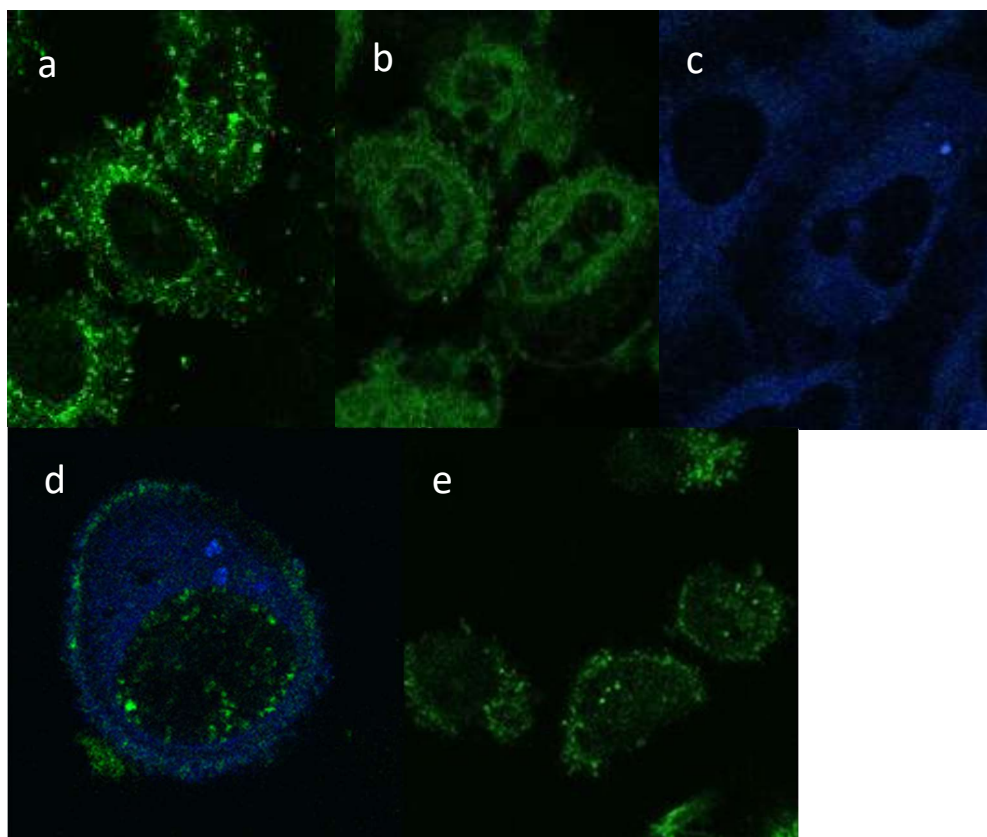


Figura 107. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de la tinción celular de células HeLa con (a) **36** a 24 horas de exposición, (b) **31** a 24 horas de exposición, (c) **34** a 24 horas de exposición, (d) **39** a 2 horas de exposición y (e) **39** a 24 horas de exposición

Otro resultado inesperado es que algunos compuestos muestran una diversidad cromática muy destacada, que no se corresponde con los datos espectrales obtenidos para los compuestos puros en disolución. Los compuestos **13**, **14**, **36** y **37** muestran emisión solo en azul mientras que **30** solo emite en verde. Los compuestos **31**, **34** y **39** muestran emisión en verde y azul o incluso en azul y en rojo en el caso de **25**. En el caso de **25** y **39** hay claras evidencias de que ambos colores no colocan en las mismas estructuras subcelulares. Este hecho puede deberse a diferencias en el entorno del compuesto en cada compartimento. Los lisosomas, por ejemplo, tienen un pH ácido, mientras que el pH es alcalino en la matriz mitocondrial junto con condiciones reductoras. También puede deberse a la asociación de los

cromóforos a algún componente celular, precipitación intracelular por acumulación o quizás a una transformación metabólica del compuesto.

La capacidad de los compuestos **40** y **41** para la tinción celular, la captación de estos por parte de la célula y su distribución intracelular fueron estudiadas por microscopia confocal y mediante grabación en video por *time-lapse* usando la línea tumoral de células HeLa. El análisis mostró una buena capacidad por parte de ambos cromóforos para ser captados y acumulados por las células. De esta forma, las células tratadas con el compuesto **41** mostraron alteraciones en sus estructuras internas y un marcaje fluorescente compatible con la fragmentación apoptótica del núcleo. Por otro lado, el compuesto **40** mostró un claro patrón de tinción de la interfase del núcleo y de cromosomas mitóticos metafásicos (Figura 108).

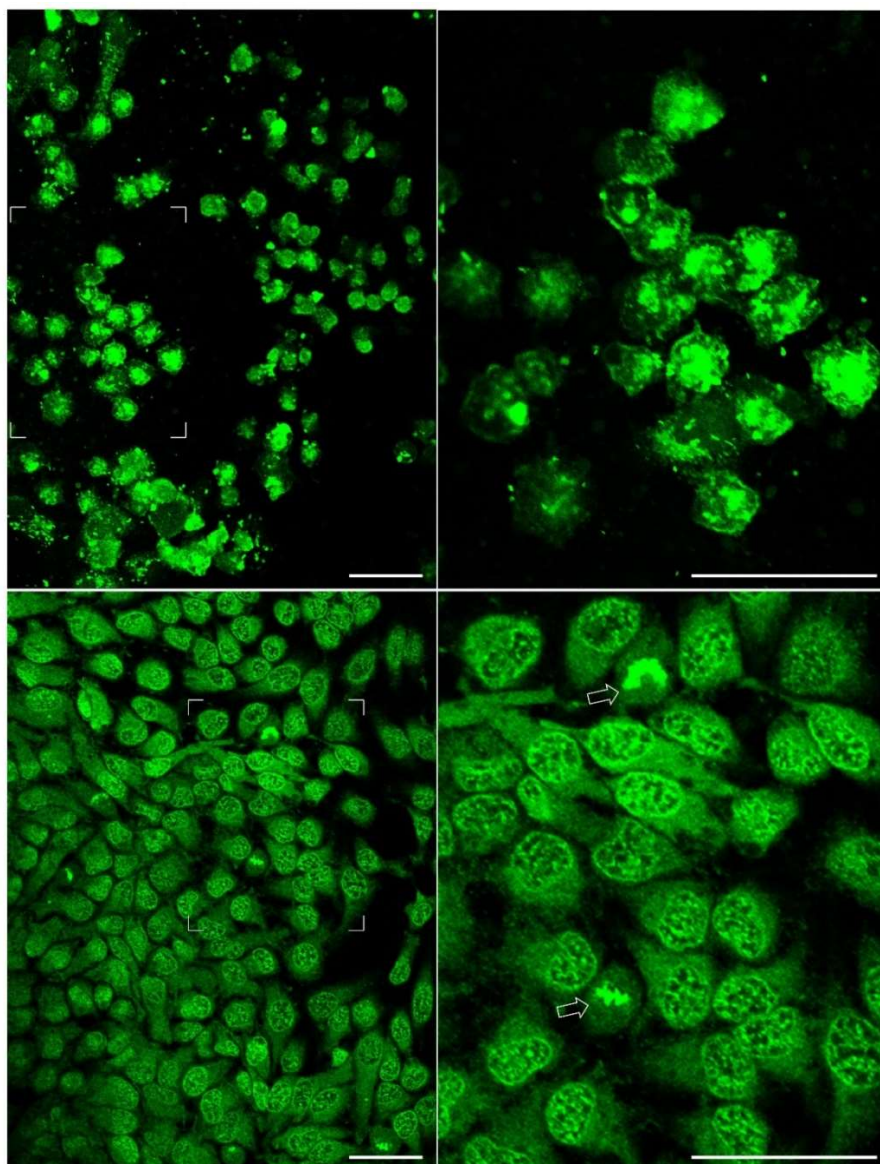


Figura 108. Células Hela vivas en cultivo después de 1h de exposición a los compuestos **40** y **41**. Paneles superiores: Compuesto **41**, 12,80 mM en DMSO diluido 1:400 en medio de cultivo (32 μ M final) Paneles inferiores: Compuesto **40**, 56,70 mM en DMSO diluido 1:400 en medio de cultivo (142 μ M final) Imágenes de microscopía confocal (láser de Argón de excitación a 488 nm, filtro de emisión 500-575 nm). Los paneles de la izquierda contienen marcas indicando el área que se amplía en los paneles de la derecha. En el panel inferior derecho se observan dos células en mitosis exhibiendo los cromosomas metafásicos con una tinción muy brillante teñidos con el compuesto **40**. La barra de escala representa 50 μ m en todos los paneles

La captación del ligando **40** por parte de la célula es presumiblemente un proceso complejo debido a una entrada activa en la célula en lugar de una difusión pasiva. La tinción al final de todo el proceso se localiza fundamentalmente en el núcleo.

Los patrones de tinción intracelular e intranuclear fueron complejos y cambiaban dependiendo de los tiempos de incubación, por lo que se decidió investigar el proceso completo mediante grabación de video *time-lapse*, usando un microscopio confocal y una cámara termostatzada. En la figura 109 se puede ver una selección de fotogramas del video grabado.

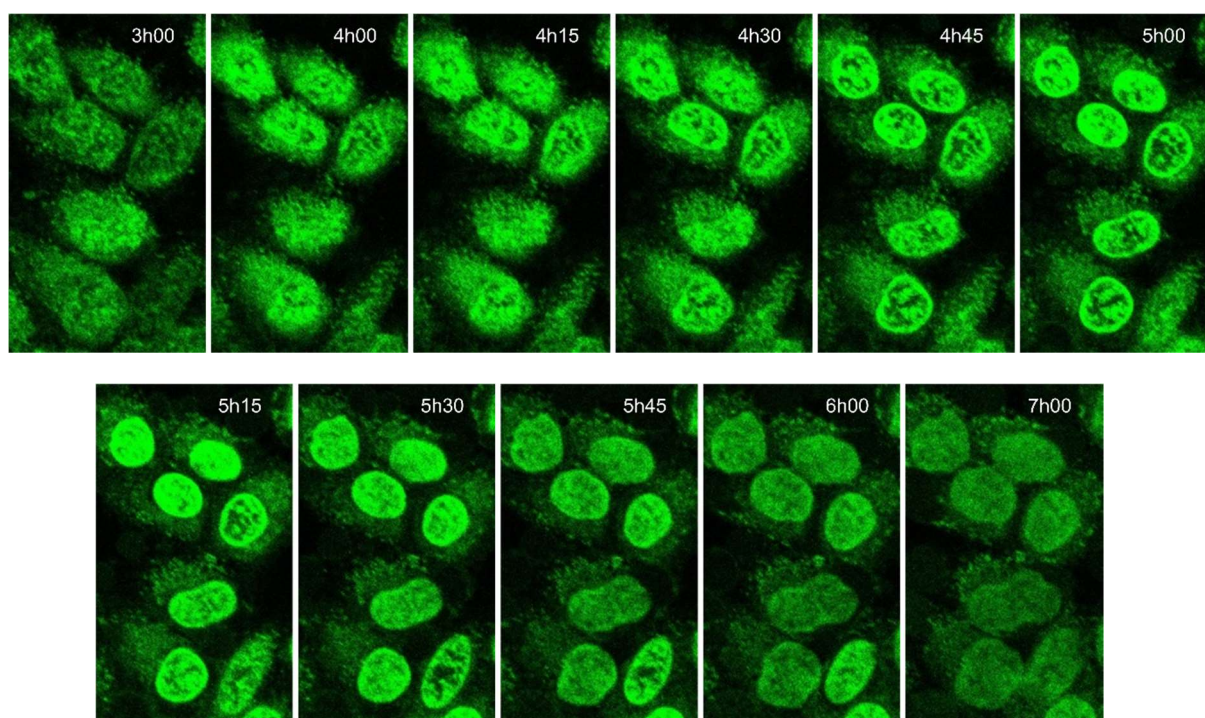


Figura 109. Fotogramas seleccionados de un video time-lapse usando microscopía confocal. Se grabaron células HeLa en cultivo expuestas al ligando **40**, 56,70 mM en DMSO diluido 1:1000 en medio de cultivo (56,7 μ M). La secuencia completa se grabó a 2 fotogramas por minuto. Para la excitación se usó un láser de Argón a 488 nm. Los filtros de emisión iban de 500 a 575 nm. Los ajustes de ganancia en la imagen se mantuvieron constantes durante todo el proceso

En los primeros estadios la fluorescencia, el cromóforo **40** se acumula en pequeñas estructuras citoplasmáticas similares a vesículas, lo cual es compatible con un mecanismo endocítico de captación del compuesto en lugar de una difusión pasiva a través de membrana. A tiempos superiores se va haciendo patente un aumento en la intensidad de fluorescencia recogida en el

video *time-lapse*. El núcleo, que inicialmente no se aprecia diferenciado, va adquiriendo una tinción brillante cuando el compuesto empieza a acumularse dentro de la célula. De hecho, se observa un patrón reproducible dentro del núcleo viéndose una acumulación en la periferia de este y en áreas internas definidas.

Una vez teñido por el compuesto, el núcleo sufre grandes cambios estructurales. Al principio parece colapsar y adquirir una forma redonda con una aparente reducción de su diámetro. Es en ese momento cuando hay un aumento homogéneo de la fluorescencia y el material dentro del núcleo se compacta. Posteriormente, sin embargo, el diámetro del núcleo vuelve a crecer y la fluorescencia interna va desapareciendo. Al final de esta etapa, el contenido del núcleo se encuentra aparentemente homogéneo con una pérdida de las estructuras internas pero sin signos de fragmentación apoptótica.

El mismo proceso ocurre en todas las células, pero no de manera sincronizada. Esta característica indica que existe un proceso celular activo de captación y distribución del compuesto por la célula en lugar de una difusión pasiva.

Una vez que el compuesto entra en el núcleo, probablemente por los poros nucleares, el patrón de fluorescencia sugiere una fuerte unión al ADN y una progresiva acumulación hasta saturar todo el contenido del núcleo. Los grandes cambios morfológicos sufridos en el núcleo sugieren una progresiva desorganización de la cromatina a medida que el cromóforo **40** se va acumulando, posiblemente debido a un desplazamiento masivo por parte del ligando de las proteínas unidas al ADN.

La capacidad de los compuestos **50** y **52-57** para la tinción celular se encuentra resumida en la figura 110. El análisis mostró una marcada capacidad de todos los compuestos para la tinción celular de células vivas tiñendo estructuras intracelulares. Los resultados sugieren una internalización no sincronizada, aparentemente activa de los ligandos por parte de las células por un mecanismo endocítico en vez de una difusión pasiva a través de la membrana plasmática. Cada compuesto muestra un patrón distinto de distribución intracelular lo cual podría sugerir algún tipo de tránsito entre las distintas estructuras intracelulares o algún tipo de reconocimiento de los distintos componentes celulares. En todos los casos el patrón de fluorescencia sugiere que estos compuestos se encuentran encerrados en vesículas y orgánulos y que no difunden de manera libre a través del citoplasma o nucleoplasma.

Los compuestos muestran también, diferentes propiedades espectrales dentro de las células vivas, incluyendo fluorescencia en diferentes colores para un mismo compuesto asociado a

estructuras subcelulares particulares. La variación en las propiedades espectrales puede ser debida a las diferentes condiciones en los distintos espacios intracelulares, asociaciones a determinadas o incluso a alguna transformación metabólica localizada de estos compuestos. Es destacable la aparente exclusión o disminución en la emisión de fluorescencia del núcleo en muchos de los derivados de dibenzopiridoimidazocinolio estudiados (**50**, **52**, **54**, **55** y **57**). Los compuestos **50**, **54**, **55** y **57** muestran fluorescencia en un único canal de excitación-emisión mientras que los compuestos **52**, **53** y **56** exhiben un patrón sin solapamiento en la fluorescencia en dos canales (**53**, **56**) o incluso 3 canales (**52**) diferentes de excitación-emisión.

Los resultados con los compuestos que emiten en un solo canal se encuentran resumidos en la fila superior de la figura 110. El compuesto **50** (canal de emisión verde) muestra una fluorescencia brillante y estructuras vesiculares discretas en el citoplasma y una leve fluorescencia difusa y no homogénea en el núcleo. El compuesto **54** (canal de emisión rojo) muestra una fluorescencia brillante en estructuras reticulares en el citoplasma y una fluorescencia muy débil y no homogénea dentro del núcleo. El compuesto **55** (canal de emisión infrarrojo) muestra una fluorescencia granular dispersa en el citoplasma y apenas fluorescencia en el núcleo. El compuesto **56** (canal de emisión rojo) muestra una fluorescencia brillante en estructuras vesiculares discretas en el citoplasma; y una fluorescencia muy débil dentro del núcleo con una distribución similar a la observada en el caso del compuesto **54**.

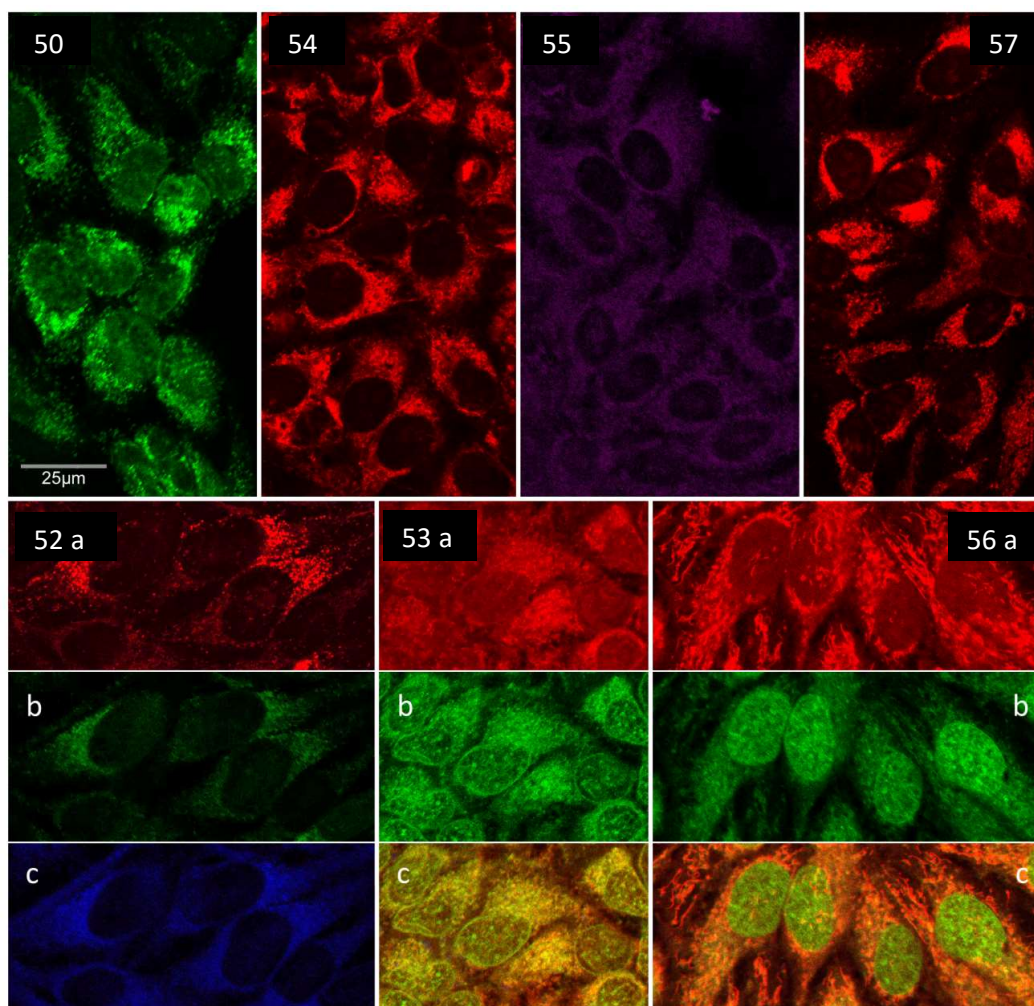


Figura 110. Microscopia confocal de fluorescencia de células HeLa vivas en cultivo tras 1 hora de exposición a los compuestos indicados a una concentración de 50 mM en DMSO diluido 1:400 en medio de cultivo (concentración final 125 μ M). La escala de 25 μ m es común para todos los paneles. Fila superior: compuestos **50**, **54**, **55** y **57** mostrando fluorescencia en un único canal. Fila inferior: compuestos **52**, **53** y **56** mostrando fluorescencia en dos o más canales. Los controles no fueron expuestos a los cromóforos y no fueron fluorescentes bajo las mismas condiciones (no mostrados)

Como se indica arriba los compuestos **52**, **53** y **56** mostraron fluorescencia en dos canales o más. Estos resultados se resumen en las filas inferiores en la figura 110 (paneles a, b y c). El compuesto **52** muestra una emisión roja muy fuerte (a) con una tinción abundante y bien definida de estructuras vesiculares localizadas en el citoplasma, así como, una emisión más

dispersa o difusa que se solapa parcialmente en verde (b) y azul (c) en el citoplasma. El núcleo muestra una fluorescencia débil en los 3 canales, más difusa en los canales azul y verde donde los patrones se solapan, con algunos puntos brillantes en el canal rojo. El compuesto **53** muestra una emisión intensa de algunas estructuras muy brillantes en el citoplasma, su patrón podría coincidir con el retículo endoplásmico, la fluorescencia presentada en ambos canales rojo (a) y verde (b) colocaliza y se observa en la superposición de imágenes en la figura (amarillo, c). El núcleo muestra una fluorescencia difusa en el canal rojo (a), sin embargo, en el canal verde (b) se observa un patrón de tinción complejo donde se aprecia la envuelta nuclear bien definida y una tinción granular no homogénea en el nucleoplasma. EL compuesto **56** muestra una emisión muy intensa en el canal rojo (a) de estructuras brillantes localizadas en el citoplasma, posiblemente mitocondrias y también una emisión más débil y difusa en el nucleoplasma. En el canal verde (b), este compuesto muestra una tinción muy intensa del núcleo con un patrón muy complejo similar al compuesto **53**. Como se aprecia en la figura, las emisiones roja y verde no se solapan (c). Al observar este hecho, se pensó que los cambios en las condiciones en los distintos compartimentos celulares influyesen en la fluorescencia diferencial mostrada para este compuesto. Debido a esto se pensó en obtener el espectro de emisión del compuesto **56** a pH=3 y a pH=11, sin embargo, ambos espectros no mostraron variaciones con respecto al obtenido a pH=7. Otra hipótesis planteada era la transformación metabólica del ligando dentro de las células. Se pensó en una reducción, y se intentó reducir el compuesto en condiciones suaves para la posterior obtención de su espectro de emisión usando NaBH_4 sin éxito. Por último, para intentar esclarecer si se trataba de una transformación metabólica, se procedió a incubar células HeLa en un flask con el compuesto **56**. Una vez pasadas 24 horas de incubación con el compuesto las células fueron lisadas. Una parte del lisado se estudió por HPLC/masas encontrando únicamente la banda correspondiente al compuesto sin ninguna alteración. Se obtuvo el espectro de emisión del lisado en el cual se aprecia únicamente la banda correspondiente al compuesto sin alteración.

Conclusiones

1. En este trabajo se han sintetizado un total de 27 cationes heteroaromáticos con un nitrógeno cuaternario en posición cabeza de puente que se han agrupado en tres series para su estudio. La síntesis de los sistemas sin sustituyentes se ha llevado a cabo utilizando la reacción de Westphal como paso clave para la obtención de los sistemas catiónicos que presentan entre 3 y 6 anillos fusionados.

Un grupo de estos cationes, seleccionados en base a su comportamiento frente a ADN y sus propiedades fotofísicas, se han funcionalizado para introducir grupos con libertad de giro con la intención de desarrollar sondas de ADN tipo *light-up*. Para ello, se utilizó la reacción de Suzuki con el objetivo de introducir sustituyentes arílicos en distintas posiciones del sistema heterocíclico. También se intentó la introducción de aminas como sustituyentes mediante sustitución nucleófila aromática, sin bien en las condiciones ensayadas no fue posible la obtención de estos últimos derivados.

2. Los cationes sintetizados, así como otros ocho sistemas previamente obtenidos en el grupo, se han estudiado utilizando distintas técnicas para conocer su unión a ADN y afinidad por el mismo, así como su selectividad de secuencia. Las constantes de afinidad obtenidas varían entre $1,8 \pm 0,4 \times 10^4$ y $4,5 \pm 1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ similares a las obtenidas por otros autores para cromóforos tipo *azonia*, siendo el compuesto **40** el que presenta el valor más elevado de la constante de afinidad ($4,5 \pm 1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Por su parte los compuestos **4**, **10**, **11** y **40** mostraron una clara preferencia por unirse a secuencias ricas en AT. Los resultados obtenidos en este trabajo y en estudios previos permitieron seleccionar a los compuestos **13**, **14** y **40** con unos máximos de emisión de 532, 511 y 536 respectivamente como los sistemas más adecuados para proceder a su funcionalización.

3. Se han realizado determinaciones fotofísicas de todos los compuestos sintetizados para los que se han obtenido los espectros de absorción y emisión y su fluorescencia. En base a los datos de fluorescencia obtenidos antes y después de su unión a ADN se ha observado que muchos de estos compuestos sufren una disminución en su intensidad de fluorescencia al unirse al ADN. Sin embargo, se ha podido identificar que los derivados del compuesto **40** funcionalizados con grupos arilo experimentan un aumento significativo de fluorescencia de hasta 3,95 (**56**) veces en el proceso de intercalación. Estos cromóforos podrían ser candidatos a emplearse como potenciales sondas fluorescentes para esta biomolécula.

4. Los estudios de dicroísmo circular, mecánica y dinámica molecular han permitido establecer el modelo de intercalación de ADN para algunos de los compuestos seleccionados. Los modelos obtenidos mediante mecánica y dinámica molecular para los cromóforos **53** y **56** avalan una unión intercalante en la que el cromóforo se encuentra orientado en un ángulo superior a 45° con respecto al eje longitudinal de los pares de base del ADN, dato observado mediante los estudios de dicroísmo circular.

5. Los estudios de actividad antiproliferativa fueron llevados a cabo mediante el ensayo de MTT. Los valores para la dosis letal 50 oscilaron entre los órdenes de 10^{-4} a 10^{-6} M, valores considerados bajos como compuestos antiproliferativos.

6. La mayoría de los compuestos estudiados en este trabajo son capaces de teñir células HeLa y penetran en estas de manera activa, ya que, por su tamaño y al estar cargados, no serían capaces de acceder por difusión pasiva. Los compuestos estudiados tiñen distintas estructuras celulares. Es de resaltar la gran intensidad de fluorescencia exhibida por el compuesto **40** dentro de las células así como su capacidad para marcar cromosomas metafásicos. Otra observación a tener en cuenta es que el compuesto **56** es capaz de emitir de manera diferencial dentro de las estructuras celulares. Este proceso puede ser debido a cambios en el entorno o a alguna asociación del ligando con biomoléculas de la célula; este fenómeno es de interés para ser estudiado en profundidad en el futuro.

Materiales y métodos

1. Procedimientos experimentales

1.1. Información general

1.2. Caracterización fotofísica del ligando

1.2.1. Obtención del máximo de absorción y absorptividad molar

1.2.2. Obtención del máximo de emisión y eficiencia cuántica

1.3. Estudios de unión de Ligando-ADN

1.3.1. Valoraciones espectrofluorimétricas con ADN para la obtención de las constantes de asociación

1.3.2. Obtención de perfiles de decaimiento y tiempos de vida media

1.3.3. Medidas de dicroísmo circular

1.3.4. Mecánica y dinámica molecular

1.4. Estudios en células vivas

1. Procedimientos experimentales

1.1. Información general

Los reactivos comerciales empleados en este trabajo fueron adquiridos de la más alta calidad disponible y usados sin ninguna purificación posterior a no ser que se especifique lo contrario. Las reacciones fueron monitorizadas por cromatografía en capa fina, las cuales se llevaron a cabo en placas de 0,25 mm de gel de sílice de E. Merck (60FS-254) usando luz ultravioleta para la visualización de las mismas. Las columnas de cromatografía se realizaron usando gel de sílice como fase estacionaria (60 F254 70-200 mm). Todos los puntos de fusión se obtuvieron con un aparato de puntos de fusión SMP3 de Stuart Scientific y se encuentran sin correcciones. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer FTIR spectrum 2000. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se obtuvieron en los espectrofotómetros Varian Gemini (200 MHz), Varian Mercury VX-300, Varian Unity 300 MHz y Varian Unity 500 MHz a temperatura ambiente. Los desplazamientos químicos vienen dados en ppm (δ) usando TMS como estándar. Las constantes de acoplamiento (J) se encuentran expresadas en Hz y se describen de la siguiente manera: s, singlete; d, doblete; t, triplete; br, ancho; m, multiplete; ap, aparente, etc. El análisis (TOF) de alta resolución se llevó a cabo en un equipo Agilent 6210 time-of-flight LC/MS.

1.2. Caracterización fotofísica del liqando

1.2.1. Obtención del máximo de absorción y absortividad molar.

Los espectros de absorción se obtuvieron en un espectrofotómetro Uv-Vis Uvikon 941 (Kontron instruments). Los compuestos estudiados fueron disueltos en DMSO y diluidos con agua milliQ. La disolución final contenía un 5% de DMSO. Se buscaba obtener una disolución madre, la cual se encontrase dentro del intervalo de linealidad de la ley de Lambert-Beer, a partir de la cual se realizaron diluciones sucesivas hasta llegar a concentraciones de cromóforo de aproximadamente 0,01 mM. De los espectros de absorción se obtiene el máximo de absorción en el máximo de la banda menos energética. Tomando los valores de absorbancia obtenidos en el máximo de la banda de absorción para cada concentración se obtiene una recta cuando se enfrentan los valores de absorbancia a las concentraciones utilizadas en cada medida. Se calcula la pendiente de esta recta siendo esta la absortividad molar para cada compuesto.

1.2.2. Obtención del máximo de emisión y eficiencia cuántica.

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro PTI Quanta Master equipado con una lámpara de xenón como fuente de luz, con monocromadores individuales de rejilla cóncava y polarizadores Glan-Thompson en las vías de emisión y excitación. La detección se llevó a cabo con un fotomultiplicador refrigerado con un sistema Peltier. Las rendijas de paso de luz tuvieron aperturas distintas en cada caso para optimizar la intensidad de luz recibida por el fotomultiplicador. Los polarizadores fueron fijados en las condiciones de “ángulo mágico” a 54,7°.

Los compuestos estudiados fueron disueltos en DMSO y diluidos con agua milliQ. La disolución final contenía un 5% de DMSO. Se obtuvieron concentraciones en torno a 0,01 mM. Excitando a la longitud de onda del máximo de absorción de cada compuesto se obtuvieron los máximos de emisión. A partir de esta disolución se realizaron 2 diluciones y se obtuvieron los espectros de emisión de las 3 disoluciones de concentración decreciente. Se obtuvieron también los valores de absorbancia para cada una de las disoluciones obtenidas. A partir de los valores del área bajo la curva de los espectros de emisión (intensidad de fluorescencia) y de las absorbancias obtenidas para cada compuesto se obtuvo una recta y de esta recta se calculó su pendiente. Se realizó la misma operación con un estándar de fluorescencia (Quinina hemisulfato, Rodamina 101 o Cumarina 153)²⁵¹ según fuese necesario, en función de las longitudes de onda de absorción de los compuestos. Se compararon las pendientes de ambas rectas y se introdujeron estos valores en la ecuación de la eficiencia cuántica y de esta manera esta fue obtenida.

$$\Phi_{lig} = \Phi_{stdr} \times \frac{AUC_{lig}/Abs_{lig}}{AUC_{stdr}/Abs_{stdr}} \times \frac{n_{lig}^2}{n_{stdr}^2}$$

Ecuación 1.

En esta ecuación, Φ_{lig} es la eficiencia cuántica del ligando y Φ_{stdr} es la eficiencia cuántica del estándar de fluorescencia. AUC es el área bajo la curva de las bandas de emisión del ligando a estudiar y del estándar de fluorescencia mientras que Abs es la absorbancia obtenida del ligando y del estándar a la misma longitud de onda a la cual se ha excitado la muestra para obtener el espectro de emisión. El cociente entre las áreas bajo la curva y la absorbancia del compuesto es la pendiente de las rectas mencionadas anteriormente. En esta ecuación se usan

los índices de refracción (n) de los disolventes usados en las disoluciones del ligando y del estándar.

1.3. Estudios de unión de ligando de Ligando-ADN

1.3.1. Valoraciones espectrofluorimétricas con ADN para la obtención de las constantes de asociación

Para obtener estas medidas se ha usado el espectrofluorímetro PTI Quanta Master usado ya en la obtención de los máximos de emisión y la eficiencia cuántica. Los compuestos estudiados fueron disueltos en DMSO y diluidos con agua milliQ. La disolución final contenía un 5% de DMSO. Se obtuvieron concentraciones en torno a 0,01 mM. La disolución de ADN empleada tenía una concentración conocida en torno a 2mg/ml. La concentración expresada en moles/par de base se halló por métodos espectrofotométricos usando la absorptividad molar de ADN ($\epsilon_{260nm} = 13200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

El ligando a estudiar se encontraba en disolución en una cubeta de base cuadrada con 10 mm de paso óptico, sobre esta disolución se adicionaron alícuotas de la disolución de ADN. Tras cada adición de ADN la mezcla se agitó con un agitador magnético durante 10 minutos, y pasado este tiempo se procedió a la obtención de los espectros de emisión, excitación y la medición de la anisotropía de fluorescencia. El número de alícuotas de ADN así como el volumen de las mismas varió en cada caso. Se dejó de añadir ADN cuando ya no existía variación entre los espectros, signo de que se había alcanzado el equilibrio. El efecto de la dilución del ligando nunca representó más del 5% de error de la concentración del ligando.

Los datos obtenidos de los espectros fueron representados en gráficas de diferencia de intensidad de fluorescencia entre la intensidad de fluorescencia del ligando solo (I_0) y el ligando con ADN ($I-I_0$) frente a los ratios molares de ligando/ADN. De estas curvas es posible obtener las constantes de asociación del ligando. La constante de asociación K de un ligando fluorescente (L) a n sitios de unión efectivos de una molécula más grande (M), asumiendo que estos n sitios de unión de M por ligando (L) son independientes y equivalentes, se puede relacionar con la intensidad de fluorescencia mediante la siguiente ecuación:

$$I = I_0 + (I_\infty - I_0) \times \frac{(1 + nK[L]_0 + K[M]_0) - \sqrt{(1 + nK[L]_0 + K[M]_0)^2 - 4nK^2[L]_0[M]_0}}{2Kn[L]_0}$$

Ecuación 2.

Donde $[M]_0$ y $[L]_0$ son las concentraciones iniciales de M y L. La variación normalizada entre la intensidad de fluorescencia (I) para L en presencia de M y en su ausencia (I_0) se puede escribir de esta manera:

$$\frac{\Delta I}{I_0} = \left(\frac{I_\infty - I_0}{I_0} \right) \times \frac{(1 + nK[L]_0 + K[M]_0) - \sqrt{(1 + nK[L]_0 + K[M]_0)^2 - 4nK^2[L]_0[M]_0}}{2Kn[L]_0}$$

Ecuación 3.

Donde K es la constante de asociación para el complejo e I_0 e I_∞ representan las intensidades de fluorescencia para el cromóforo libre y el cromóforo asociado en su totalidad. Esta ecuación puede ser modificada de la siguiente manera:

$$\frac{\Delta I}{I_0} = \left(\frac{I_\infty - I_0}{I_0} \right) \times \frac{(1/[L]_0 + nK + KR) - \sqrt{(1/[L]_0 + nK + KR)^2 - 4nK^2R}}{2Kn}$$

Ecuación 4.

Donde R es el ratio molar entre $[M]_0/[L]_0$. Como M corresponde al ADN $[M]_0$ es la concentración por mol de pares de base y n es el número de pares de base por ligando asociado.

1.3.2. Obtención de perfiles de decaimiento y tiempo de vida media

Las medidas de decaimiento de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro de resolución temporal modelo FL900 de la casa Edimburgh Instruments. Para la realización de estas medidas se utilizó, como fuente de excitación, un nanoled monocromático a 335 nm o una lámpara de hidrógeno, según las longitudes de onda de excitación de los ligandos. En las vías de excitación y emisión se usaron una pareja de monocromadores cóncavos de rejilla. Se usó un fotomultiplicador sensible al rojo para detectar los fotones, el cual estaba refrigerado por un sistema Peltier. La adquisición de los datos se llevó a cabo utilizando 1024 canales en un analizador multicanal con una ventana de tiempo con 200 ns de amplitud. En los experimentos realizados se consiguió un máximo un total de 10000 cuentas.

Los compuestos estudiados fueron disueltos en DMSO y diluidos con agua milliQ. La disolución final contenía un 5% de DMSO. Se midieron disoluciones con concentraciones en torno a 0,01

mM. Una vez obtenidos los perfiles de decaimiento de fluorescencia fueron ajustados a funciones de decaimiento multiexponencial usando el método iterativo de deconvolución.²⁶⁵ Para estas medidas se usaron cubetas de base cuadrada de 10 mm de paso óptico.

Una vez ajustados los datos a esta función se obtienen los parámetros A, B1, τ_1 , B2, τ_2 , B3, τ_3 ... en función de las componentes presentes en el perfil de decaimiento. Esta serie de parámetros se utilizaron para obtener los tiempos de vida media introduciéndolos en la siguiente expresión:

$$\tau = \frac{\sum_{i=1}^n \tau_i^2 B_i}{\sum_{i=1}^n \tau_i B_i}$$

Ecuación 5.

1.3.3. Medidas de dicroísmo circular

Las medidas de dicroísmo circular fueron llevadas a cabo a 25°C en un espectropolarímetro JASCO 715. Cada espectro obtenido fue la media de 3 barridos a una velocidad de 50 nm/min con 0,125 s de respuesta. La sensibilidad y la resolución se fijaron a 20 mdeg y 0,5 nm respectivamente.

Los compuestos estudiados fueron disueltos en DMSO y diluidos con agua milliQ. La disolución final contenía un 5% de DMSO. Se obtuvieron disoluciones en torno a 0,03 mM. A partir de esta concentración se realizaron mezclas entre la disolución de cromóforo y la de ADN para conseguir distintos ratios molares. Las mezclas Ligando/ADN y las disoluciones de ADN y de ligando se midieron para obtener los espectros de dicroísmo circular. Las medidas en la región donde absorbe mayoritariamente el cromóforo (a partir de 300 nm) fueron realizadas en cubetas de 1 cm de paso óptico, sin embargo, en la zona donde principalmente absorbe el ADN las medidas fueron realizadas usando una cubeta de 0,1 cm de paso óptico.

1.3.4. Mecánica y dinámica molecular

Los estudios de mecánica y dinámica molecular fueron llevados a cabo por el Profesor Francisco Mendicuti, catedrático del Departamento de Química analítica, Química física e Ingeniería química de la Universidad de Alcalá. Las estructuras de mínima energía de unión para los complejos Ligando/ADN se obtuvo mediante la aproximación de cada ligando a un fragmento de ADN el cual contiene una secuencia de 12 nucleótidos (CGCGAATTCGCG)

presente en el ADN de timo bovino (ctADN). Esta aproximación se realiza por el surco mayor con el centro de masa de del ligando sobre el eje y en el sistema de coordenadas representado en la figura 111. No se tuvo en cuenta la posibilidad de que los ligandos se uniesen al surco debido a las intensidades y los signos de las señales observadas en los espectros de dicroísmo circular inducido. Las estructuras de mínima energía de unión optimizadas para los complejos fueron usadas como las conformaciones iniciales para las simulaciones de dinámica molecular. Los histogramas de muchos parámetros relacionados con la estructura de los complejos se obtuvieron mediante el análisis de las trayectorias en las dinámicas moleculares. Los cálculos se realizaron con Sybyl X-2.0²⁶⁶ y Tripos Force Field.²⁶⁷

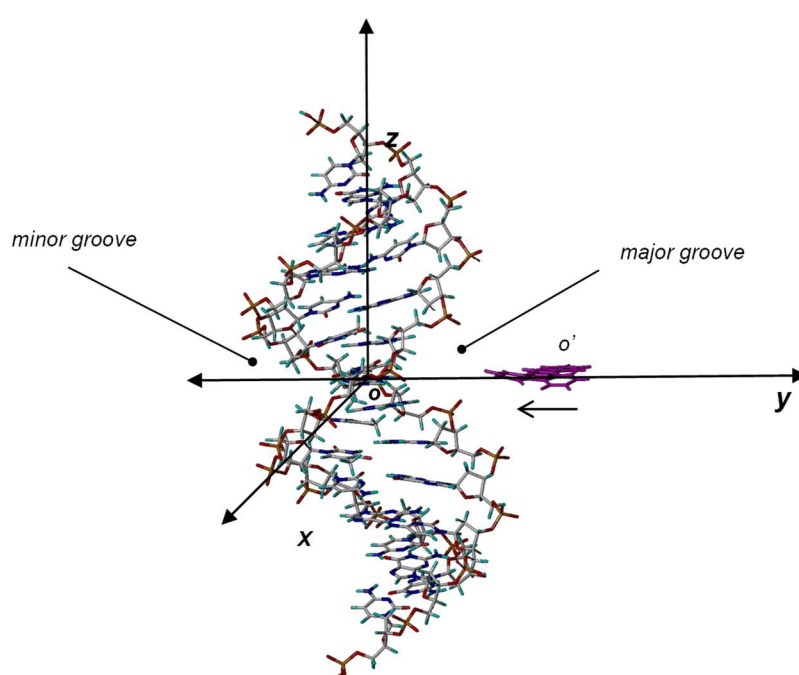


Figura 111. Sistema cartesiano usado para definir la aproximación del ligando al ADN. El par central de bases AT-TA se encontraban casi paralelas al plano formado por los ejes xy. En esta foto se muestra la orientación más favorable del ligando

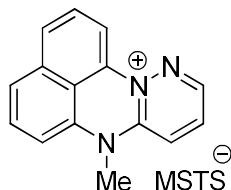
1.4. Estudios en células vivas.

Estas medidas fueron realizadas en colaboración con el Dr. Alberto Domingo, profesor titular del departamento de Biología de sistemas. Para estos estudios se utilizaron células HeLa. Estas células se mantuvieron a 37°C en un entorno con una concentración de CO₂ del 5% en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino y 100 unidades/mL de penicilina y estreptomicina. Para los estudios de tinción de células vivas, las células se hicieron crecer en cubreobjetos dentro de los pocillos y fueron teñidas con las condiciones indicadas en cada caso. Las imágenes estáticas y los videos time-lapse fueron obtenidos usando un microscopio confocal BioRad.

Los estudios de citotoxicidad se llevaron a cabo usando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).²⁶⁸ Las células se sembraron en placas de 24 pocillos con una densidad de $1,5 \times 10^4$ células por pocillo e incubadas en un medio que contenía el compuesto a estudiar con distintas concentraciones durante 24-48 horas. A cada pocillo se le añadieron 100 µL de MTT y las placas se incubaron a 37°C durante 4 horas para permitir que se formen los cristales de formazan a partir de MTT al interaccionar con células metabólicamente activas o viables. Pasado este tiempo se desecha el medio con MTT de los pocillos. Los cristales intracelulares de formazan se disolvieron añadiendo 100 µL de DMSO a cada pocillo y fueron agitados durante 10 minutos. Las absorbancias fueron registradas usando una lectora de placas multipocillo.

Parte experimental

7-Methyl-7H-pyridazino[1,6-a]perimidin-12-ium tetrafluoroborate (6)



A solution of MSH (108 mg, 0.5 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (3 mL) was added to a solution of 1,2-dimethyl-1H-perimidine (75 mg, 0.38 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL). After stirring 15 hours at room temperature, the formed N-amine salt was isolated by filtration and washed with Et_2O and petroleum ether. A mixture of this N-amine salt (110 mg, 0.27 mmol), DODO (32 mg, 0.27 mmol) and triethylamine (37 μL , 0.27 mmol) in anhydrous DMF (3 mL) was heated at 70° C for 2 hours. The formed dark red solid residue was filtrated and treated with HBF_4 (1.2 eq, 48% w/w water) at room temperature for 7 hours. The reaction crude was purified by alumina column chromatography (gradient from CH_2Cl_2 to 1:9 MeOH/ CH_2Cl_2) to give compound **6** as a dark red powder (53 mg, 0.17 mmol, 43%).

^1H -NMR (200 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 3.73 (s, 3H), 7.21 (dd, $J = 7.2\text{Hz}$, $J = 1.3\text{Hz}$, 1H), 7.54-7.68 (m, 3H), 7.83 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 8.0-8.3 (m, 2H), 8.37 (dd, $J = 9.8\text{Hz}$, $J = 1.3\text{Hz}$, 1H), 8.84 (dd, $J = 4.2\text{Hz}$, $J = 0.85\text{Hz}$, 1H).

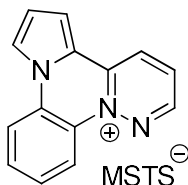
^{13}C -NMR (50 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 35.5, 109.6, 111.9, 121.6, 124.1, 126.1, 128.1, 129.3, 129.6, 134.5, 135.1, 135.9, 146.0, 151.1.

IR (KBr) ν cm^{-1} : 765, 1179, 1489, 1583, 1640, 2358, 3059, 3432.

MS (ESI): $[\text{M}^+]$ 234.1; HRMS m/z calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3$ $[\text{M}^+]$: 234.1026. Found 234.1032.

M.p.: 199-205°C.

Pyridazino[1,6-a]pyrrolo[2,1-c]quinoxalin-13-ium mesitylenesulfonate (7)



A solution of MSH (88 mg, 0.41 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (3 mL) was added to a solution of 4-methylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline (62 mg, 0.34 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL). After stirring 5 hours at room temperature, the formed N-amine salt was isolated by filtration and washed with Et_2O and petroleum ether. A mixture of this N-amine salt (100 mg, 0.25 mmol), DODO (30 mg, 0.25 mmol) and triethylamine (35 μL , 0.25 mmol) in EtOH (4 mL) was heated at 76°C for 4.5 h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure until dryness, triturated with acetone, filtered and washed with acetone and petroleum ether to give compound **7** as a dark green powder (39 mg, 0.09, mmol, 27%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz DMSO) δ (ppm): 2.15(s, 3H), 2.47 (s, 6H), 6.72 (s, 2H), 7.35 (dd, $J = 2.6\text{Hz}$, $J = 4.2\text{Hz}$, 1H), 7.81 (tap, $J = 8.4\text{Hz}$, $J = 8.7\text{Hz}$, 1H), 8.02 (tap, $J = 8.4\text{Hz}$, $J = 8.7\text{Hz}$, 1H), 8.25 (dd, $J = 4.2\text{Hz}$, $J = 1.2\text{Hz}$, 1H), 8.38 (dd, $J = 9\text{Hz}$, $J = 4.7\text{Hz}$, 1H), 8.64 (d, $J = 8.7\text{Hz}$, 1H), 8.85 (d, $J = 8.7\text{Hz}$, 1H), 9.03 (d, $J = 1.6\text{Hz}$, 1H), 9.31 (dd, $J = 9.0\text{Hz}$, $J = 1.6\text{Hz}$, 1H), 9.38 (dd, $J = 4.7\text{Hz}$, $J = 1.6\text{Hz}$, 1H).

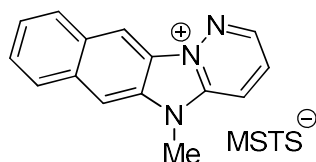
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz DMSO) δ 19.8, 22.3, 104.1, 115.8, 116.3, 117.1, 119.7, 120.5, 122.6, 126.8, 127.2, 129.4, 130.4, 131.9, 132.1, 135.4, 135.7, 139.4, 142.4, 146.1, 148.9.

IR (KBr) $\nu\text{ cm}^{-1}$: 680, 1189, 1451, 1624, 3466.

MS (ESI): $[\text{M}^+]$ 220.1. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: C, 65.85; H, 5.05; N, 10.02. Found: C, 65.66; H, 5.12; N, 9.91.

M.p: $135\text{--}138^\circ\text{C}$.

5-Methyl-5H-naphtho[2',3':4,5]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-12-ium mesitylenesulfonate (**9**)



A solution of MSH (174 mg, 0.81 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (2 mL) was added to a solution of 1,2-dimethyl-1H-naphtho[2,3-*d*]imidazole (106 mg, 0.54 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL). After stirring 1 hour at room temperature, the formed N-amine salt was isolated by filtration and washed with Et_2O and petroleum ether. A mixture of this N-amine salt (206 mg, 0.50 mmol), DODO (60 mg, 0.50 mmol) and triethylamine (70 μL , 0.50 mmol) in anhydrous DMF (3 mL) was heated at 70°C for 1 hour. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure until dryness,

trituated with Et₂O, filtered and washed with acetone to give compound **9** as a yellow powder (99.7 mg, 0.23 mmol, 43%).

¹H-NMR (300 MHz, MeOD) δ (ppm): 2.05 (s, 3H); 2.41 (s, 6H); 4.2 (s, 3H); 6.75 (s, 1H); 7.70-7.61 (m, 2H); 8.26- 8.15 (m, 3H); 8.55 (s, 1H); 8.74 (d, *J* = 8.2Hz, 1H); 8.99 (s, 1H); 9.07 (d, *J* = 4.6Hz, 1H).

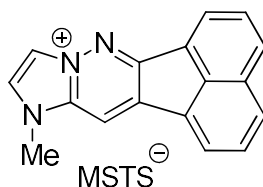
¹³C-NMR (75 MHz, MeOD) δ (ppm): 20.8, 23.2, 31.3, 110.9, 112.9, 121.4, 128.0, 128.8, 129.1, 129.4, 129.9, 131.6, 131.9, 132.2, 132.5, 135.3, 138.1, 140.0, 140.8, 144.5, 147.3.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3045, 2365, 1622, 1522, 1191, 1085, 1015, 677.

MS (ESI): [M⁺] 234.1; HRMS *m/z* calculated for C₁₅H₁₂N₃ [M⁺]: 234.1026. Found 234.1027.

M.p: 233-235°C.

11-Methyl-11H-acenaphtho[1,2-*e*]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-8-ium mesitylenesulfonate (10)



A solution of MSH (0.61 g, 2.83 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (3 mL) was added to a solution of commercially available 1,2-dimethylimidazole (0.18 g, 1.89 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL). After stirring 1 hour at room temperature, the formed N-amine salt was isolated by filtration and washed with Et₂O and petroleum ether. A mixture of this N-amine salt (0.49 g, 1.59 mmol), acenaphthoquinone (0.29 g, 1.59 mmol) and sodium acetate (0.13 g, 1.59 mmol) in ethanol (12 mL) was heated at reflux temperature for 5 hours. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure until dryness, trituated with water, filtered and washed with water and acetone to give compound **10** as a pale brown solid (0.61g, 1.33 mmol, 71%).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 2.12 (s, 3H), 2.47 (s, 6H), 4.41 (s, 3H), 6.7 (s, 2H), 7.9 (tap, *J* = 7.6Hz, 2H), 8.3-8.47 (m, 1H), 8.85 (d, *J* = 2,1Hz, 1H), 9.37 (s, 1H).

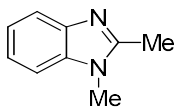
¹³C-NMR (50 MHz, DMSO) δ 19.7, 22.2, 35.9, 111, 117.9, 122.6, 123.5, 126.2, 128.1, 128.8, 128.9, 129.2, 129.6, 130.4, 134, 134.9, 135, 135.2, 135.5, 142.3.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 620, 724, 753, 772, 788, 1011, 1080, 1187, 1331, 1402, 1469, 1527, 1547, 1609, 2929, 2981, 3016, 3045.

MS (ESI+) m/z : 258.1. Anal. Calcd for C₂₆H₂₃N₃O₃S: C, 68.25; H, 5.07; N, 9.18. Found: C, 67.96; H, 5.11; N, 9.36.

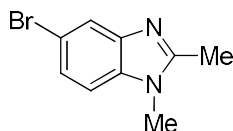
M.p: 260-261°C.

1,2-Dimethyl-1*H*-benzo[d]imidazole²⁴⁵



NaH (60%) (100 mg, 1.1 eq.) was added, under Argon, to a solution of 2-methylbenzimidazole (300 mg, 1 eq.) in dry THF (7 ml) in an ice bath (0°C). After 25 minutes MeI (170 μ l, 1.2 eq.) was added to the reaction mixture which was allowed to reach room temperature. After 2 hours the solvent was removed under reduced pressure. Flash column chromatography (95:5 CH₂Cl₂/MeOH) in silica was performed to the residue to obtain the desired product with 80% yield (270 mg).

5-Bromo-1,2-dimethyl-1*H*-benzo[d]imidazole (**20**)



Methyl orthoacetate (0.220 ml, 1.2 eq) was added to a solution of compound **19** (291 mg, 1 eq.) and I₂ (36.7 mg 0.1 eq) in dry CH₃CN (6 ml) under Argon. The reaction mixture was stirred at room temperature. After 24 hours the reaction was quenched adding water. The reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂ and dried with Na₂SO₄. Flash column chromatography (AcOEt) in silica was performed to the residue to obtain the desired product with 77% yield (253 mg).

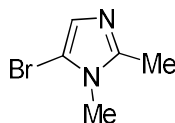
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.61 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.1 (dd, *J* = 1.9 Hz, 8.4 Hz, 1H), 6.8 (d, *J* = 8.4, 1H), 3.49 (s, 3H), 2.42 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 152.8, 143.6, 124.8, 121.6, 114.6, 109.9, 30.1, 13.9.

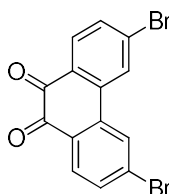
IR (KBr) ν cm⁻¹: 1510, 1473, 1395, 1040, 909, 882, 795, 741

HRMS (ESI-TOF) for C₉H₉BrN₂ *m/z* (Calc.): 225.0022, *m/z* (found): 225.0021

m.p: 132-136°C

5-Bromo-1,2-dimethyl-1*H*-imidazole (21)²⁴⁶

N-bromosuccinimide (723 mg, 1 eq) was added, under Argon, to a solution of 1,2-dimethylimidazole (390 mg, 1 eq) in CH₂Cl₂ (10 ml) in an ice bath (0°C). The reaction mixture was stirred. After 20 minutes the reaction was quenched diluting the mixture with CH₂Cl₂ (50 ml). The organic layer was washed with water and dried with Na₂SO₄. No further purification was needed to obtain the desired product with 79% yield (561 mg).

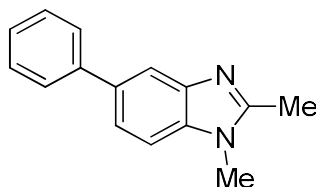
3,6-Dibromophenanthrene-9,10-dione²⁴⁷

Bromine (50 µl, 2 eq.) was added under Argon to a suspension of a mixture of 9,10-phenanthroquinone (100 mg, 1 eq) and benzoyl peroxide (12 mg, 0.1 eq) in dry nitrobenzene (2 ml) in a sealed tube. Once the mixture was homogeneous, the reaction mixture was stirred and irradiated with 350 nm light for 4 hours. Upon cooling the sample to room temperature, the mixture was filtered and washed with hexane (x3). The filter cake was transferred to an Erlenmeyer flask, suspended in hexane and stirred for 15 minutes. The solids were then filtered and this process was repeated 2 more times. A dark yellow powder was obtained with no further purification with 77% yield (141 mg).

General procedure for Suzuki coupling of heterocycles

A solution of compound **20** (1 eq) and $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (0,05 eq.) in DMF was stirred and heated under Argon for 15 minutes. After this time a solution of the corresponding boronic acid (1 eq.) in EtOH was added. The mixture was stirred and heated under reflux. After 15 minutes a solution of Na_2CO_3 in water (2M) was added. The reaction mixture was heated under reflux for 24 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature and was extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with brine and then was dried with MgSO_4 . Flash column chromatography in silica was performed to the residue to obtain the desired product.

1,2-Dimethyl-5-phenyl-1*H*-benzo[d]imidazole (**27**)



Following the general procedure for Suzuki coupling of heterocycles A solution of compound **20** (312 mg, 1 eq) and $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (80 mg, 0,05 eq.) in DMF (5 ml) was stirred and heated under Argon for 15 minutes. After this time a solution of phenylboronic acid (169 mg, 1 eq.) in EtOH (5 ml) was added. The mixture was stirred and heated under reflux. After 15 minutes a solution of Na_2CO_3 in water (4.6 ml) (2M) was added. The reaction mixture was heated under reflux for 24 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature and was extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with brine and then was dried with MgSO_4 . Flash column chromatography (1:9 Hex/AcOEt) in silica was performed to the residue to obtain the desired product with 88% yield (273 mg).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (s, 1H), 7.63 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.50-7.41 (m, 3H), 7.34-7.27 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.61 (s, 3H)

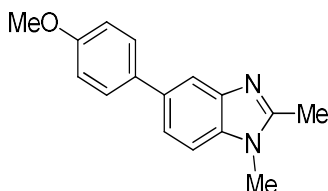
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 142.5, 141.7, 137.4, 135.5, 128.6, 127.2, 126.5, 121.7, 117.1, 108.9, 29.9, 13.8.

IR (KBr) ν cm^{-1} : 3035, 1621, 1514, 1477, 1401, 1320, 752, 669

HRMS (ESI-TOF) for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2$ m/z (Calc.): 223.1230, m/z (found): 223.1231

m.p: 187-190°C

5-(4-Methoxyphenyl)-1,2-dimethyl-1H-benzo[d]imidazole (28)



Following the general procedure for Suzuki coupling of heterocycles A solution of compound **20** (252.5 mg, 1 eq) and Pd(PPh₃)₄ (65 mg, 0.05 eq.) in DMF (4 ml) was stirred and heated under Argon for 15 minutes. After this time a solution of *p*-methoxyphenylboronic acid (171 mg, 1 eq.) in EtOH (4 ml) was added. The mixture was stirred and heated under reflux. After 15 minutes a solution of Na₂CO₃ in water (3.9 ml) (2M) was added. The reaction mixture was heated under reflux for 24 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature and was extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with brine and then was dried with MgSO₄. Flash column chromatography (AcOEt) in silica was performed to the residue to obtain the desired product with 57% yield (175 mg).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.88 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 2.63 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.7, 152.3, 143.1, 135.1, 134.6, 128.3, 121.4, 116.9, 116.9, 114.1, 108.9, 55.3, 29.9, 13.8.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 2936, 1604, 1513, 1482, 1273, 1245, 1180, 1030, 835, 800

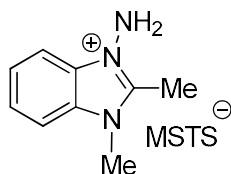
HRMS (ESI-TOF) for C₁₆H₁₆N₂O *m/z* (Calc.): 253.1335, *m/z* (found): 253.1332

m.p: 168-172°C

General procedure for N-amination of Heterocycles.

A solution of MSH (1.5 eq) in dry CH₂Cl₂ (3 ml) was added dropwise to a solution of the starting heterocycle (1 eq) in dry CH₂Cl₂ (3 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature between 5 and 24 hours. After this time the reaction mixture was filtered, the solid phase was isolated and washed with CH₂Cl₂ and petroleum ether to give the desired product.

3-Amino-1,2-dimethyl-1*H*-benzo[d]imidazol-3-ium 2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (15)



Following the general procedure for N-amination of heterocycles, a solution of MSH (342 mg 1.5 eq) in dry CH₂Cl₂ (3 ml) was added dropwise to a solution of the starting heterocycle (155 mg 1 eq) in dry CH₂Cl₂ (3 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 hours. After this time the reaction mixture was filtered, the solid phase was isolated and washed with CH₂Cl₂ and petroleum ether to give the desired product with 50% yield (191 mg).

¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆) δ 7.91 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.66 – 7.52 (m, 2H), 6.68 (s, 4H), 3.93 (s, 3H), 2.80 (s, 3H), 2.45 (s, 6H), 2.14 (s, 3H).

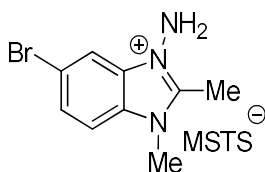
¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆) δ 151.9, 135.6, 135.5, 135.1, 131.0, 129.3, 129.1, 125.3, 125.2, 125.1, 125.0, 111.9, 111.8, 111.7, 31.2, 22.2, 19.8, 9.1.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3252, 3149, 1668, 1546, 1474, 1086, 1013, 754, 678

HRMS (ESI-TOF) for C₉H₁₂N₃⁺ *m/z* (Calc.): 162.1033, *m/z* (found): 162.1035

m.p: 207-209°C

3-Amino-5-bromo-1,2-dimethyl-1*H*-benzo[d]imidazol-3-ium 2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (22)



Following the general procedure for N-amination of heterocycles, a solution of MSH (302 mg 1.5 eq) in dry CH₂Cl₂ (3 ml) was added dropwise to a solution of the starting heterocycle **20** (210 mg 1 eq) in dry CH₂Cl₂ (6 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature for

24 hours. After this time the reaction mixture was filtered, the solid phase was isolated and washed with CH₂Cl₂ and petroleum ether to give the desired product with 90% yield (369 mg).

¹H NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 8.04 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.70 (s, 2H), 6.65 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 2.80 (s, 3H), 2.45 (s, 6H), 2.15 (s, 3H)

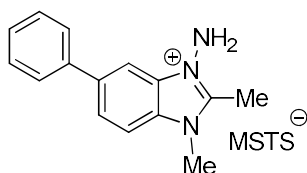
¹³C NMR (125 MHz, DMSO d₆) δ 153.1, 135.5, 135.4, 135.1, 135.0, 129.2, 129.1, 128.1, 114.7, 114.5, 114.0, 31.5, 22.2, 19.8, 9.3.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3231, 3127, 1474, 1380, 1214, 1179, 1084, 1015, 681

HRMS (ESI-TOF) for C₉H₁₁BrN₃⁺ *m/z* (Calc.): 240.0125, *m/z* (found): 240.0125

m.p.: 242-245°C

3-Amino-1,2-dimethyl-5-phenyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-3-ium 2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (29)



Following the general procedure for N-amination of heterocycles, a solution of MSH (218 mg 1.5 eq) in dry CH₂Cl₂ (3 ml) was added dropwise to a solution of the starting heterocycle **32** (150 mg 1 eq) in dry CH₂Cl₂ (3 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 hours. After this time the reaction mixture was filtered, the solid phase was isolated and washed with CH₂Cl₂ and petroleum ether to give the desired product with 93% yield (273 mg).

¹H NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 8.09 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.78-7.75 (m, 2H) 7.57-7.44 (m, 3H) 6.70 (s, 4H), 3.98 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 2.45 (s, 6H), 2.14 (s, 3H)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO d₆) δ 152.6, 142.3, 138.5, 137.6, 135.6, 135.3, 131.8, 129.2, 128.8, 128.7, 127.6, 126.5, 124.4, 112.6, 109.6, 31.3, 22.2, 19.7, 9.2.

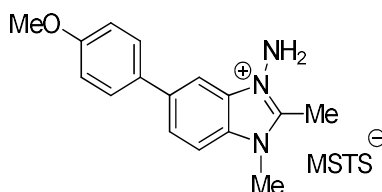
IR (KBr) ν cm⁻¹: 3511, 3270, 3044, 1655, 1479, 1216, 1179, 1087, 1016, 763, 682

HRMS (ESI-TOF) for C₁₅H₁₆N₃⁺ *m/z* (Calc.): 238.1339, *m/z* (found): 238.1342

m.p: 221-224°C

**3-Amino-5-(4-methoxyphenyl)-1,2-dimethyl-1*H*-benzo[d]imidazol-3-ium
trimethylbenzenesulfonate (30)**

2,4,6-



Following the general procedure for N-amination of heterocycles, a solution of MSH (352 mg 1.5 eq) in dry CH₂Cl₂ (4 ml) was added dropwise to a solution of the starting heterocycle **33** (275 mg 1 eq) in dry CH₂Cl₂ (4 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 hours. After this time the reaction mixture was filtered, the solid phase was isolated and washed with CH₂Cl₂ and petroleum ether to give the desired product with 62% yield (318 mg).

¹H NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 8.03 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.1 Hz 2H) 7.09 (d, *J* = 7.8 Hz 2H) 6.70 (s, 2H) 6.68 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.82 (s, 3H), 2.45 (s, 6H), 2.14 (s, 3H)

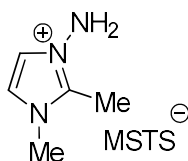
¹³C NMR (125 MHz, DMSO d₆) δ 158.8, 152.3, 142.3, 137.3, 135.6, 135.3, 131.9, 130.8, 129.2, 128.3, 127.7, 124.0, 114.1, 112.5, 108.8, 54.8, 31.3, 22.2, 19.7, 9.1.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3253, 3145, 1671, 1607, 1487, 1204, 1188, 1087, 1015, 679

HRMS (ESI-TOF) for C₁₆H₁₈N₃O⁺ m/z (Calc.): 268.1444, m/z (found): 268.1446

m.p: 233-237°C

3-Amino-1,2-dimethyl-1*H*-imidazol-3-ium 2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (16)



Following the general procedure for N-amination of heterocycles, a solution of MSH (672 mg 1.5 eq) in dry CH₂Cl₂ (4 ml) was added dropwise to a solution of the starting heterocycle (200

mg 1 eq) in dry CH₂Cl₂ (4 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hours. After this time the reaction mixture was filtered, the solid phase was isolated and washed with CH₂Cl₂ and petroleum ether to give the desired product with 65% yield (420 mg).

¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆) δ 7.51 (s, 2H), 6.71 (s, 2H), 6.58 (s, 2H), 3.70 (s, 3H) 2.46 (s, 9H) 2.14 (s, 3H)

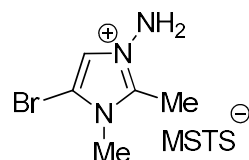
¹³C NMR (125 MHz, DMSO d₆) δ 143.9, 142.3, 135.7, 135.3, 129.3, 121.9, 119.8, 34.40, 22.2, 19.8, 7.9.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3291, 3121, 1605, 1470, 1249, 1203, 1190, 1088, 1017, 680

HRMS (ESI-TOF) for C₅H₁₀N₃⁺ m/z (Calc.): 112.0875, m/z (found): 112.0877

m.p: 180-183°C

3-Amino-5-bromo-1,2-dimethyl-1*H*-imidazol-3-ium 2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (24)



Following the general procedure for N-amination of heterocycles, a solution of MSH (509 mg 1.5 eq) in dry CH₂Cl₂ (3 ml) was added dropwise to a solution of the starting heterocycle **21** (276 mg 1 eq) in dry CH₂Cl₂ (3 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hours. After this time the reaction mixture was filtered, the solid phase was isolated and washed with CH₂Cl₂ and petroleum ether to give the desired product with 74% yield (456 mg).

¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆) δ 7.85 (s, 1H), 6.73 (s, 2H), 6.70 (s, 2H), 3.63 (s, 3H) 2.48 (s, 6H), 2.17 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆) δ 145.6, 135.6, 135.1, 129.1, 122.4, 104.2, 33.3, 22.2, 19.8, 9.2

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3114, 1661, 1522, 1465, 1400, 1256, 1130, 835, 730, 670.

HRMS (ESI-TOF) for C₅H₉BrN₃⁺ m/z (Calc.): 189.9974, m/z (found): 189.9972

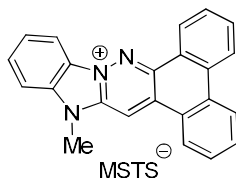
m.p: 203-209°C

General procedure for Aza-Westphal condensation

The dicarbonylic compound (1.2 eq) and Sodium Acetate (1.2 eq) were added to a suspension of the azolium salt (1 eq) in EtOH. The reaction mixture was stirred and heated under reflux between 4 and 72 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature. Removal of solvent in vacuo gave a residue that was triturated with cooled water and filtered. The residue was washed with cooled water and AcOEt several times to give a solid that was solved in the minimum amount of MeOH and cool Et₂O was added in an ice bath until precipitation. The solid was filtered to give the desired compound.

15-Methyl-15*H*-dibenzo[*f,h*]benzo[4,5]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium trimethylbenzenesulfonate (13)

2,4,6-



Following the general procedure for Aza-Westphal condensation, 9,10-phenanthrenequinone (67.5 mg, 0.32 mmol) and Sodium Acetate (27 mg, 0.32 mmol) were added to a suspension of the azolium salt **15** (100 mg, 0.27 mmol) in EtOH (6 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 4 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature. Removal of solvent in vacuo gave a residue that was triturated with cooled water and filtered. The residue was washed with cooled water and AcOEt several times to give a solid that was solved in the minimum amount of MeOH and cool Et₂O was added in an ice bath until precipitation. The solid was filtered to give the desired compound with 76% yield (109.4 mg).

¹H NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 9.95 (s, 1H), 9.10 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 9.01 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.75-8.65 (m, 3H), 8.29 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H) 8.06 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.93-7.76 (m, 5H), 6.66 (s, 1H), 4.41 (s, 3H), 2.44 (s, 6H), 2.11 (s, 3H)

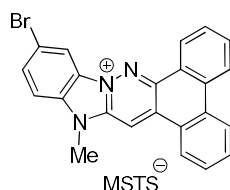
¹³C NMR (125 MHz, DMSO d₆) δ 143.7, 142.3, 138.8, 135.6, 135.3, 132.5, 132.1, 131.8, 131.2, 130.3, 130.2, 129.4, 129.2, 128.5, 128.5, 126.9, 126.1, 125.4, 124.9, 124.8, 124.4, 123.8, 123.5, 113.3, 112.5, 112.5, 30.6, 22.2, 19.8.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3038, 2987, 1606, 1482, 1465, 1449, 1387, 1328, 1198, 1083, 1015, 916, 766, 725, 674

HRMS (ESI-TOF) for $C_{23}H_{16}N_3^+$ m/z (Calc.): 334.1339, m/z (Found): 334.1341

m.p: 294-296°C

12-Bromo-15-methyl-15*H*-dibenzo[*f,h*]benzo[4,5]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium 2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (23)



Following the general procedure for Aza-Westphal condensation, 9,10-phenanthrenequinone (57 mg, 0.27 mmol) and Sodium Acetate (22 mg, 0.27 mmol) were added to a suspension of the azolium salt **22** (100 mg, 0.23 mmol) in EtOH (5 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 16 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature. Removal of solvent in vacuo gave a residue that was triturated with cooled water and filtered. The residue was washed with cooled water and AcOEt several times to give a solid that was solved in the minimum amount of MeOH and cool Et₂O was added in an ice bath until precipitation. The solid was filtered to give the desired compound with 78% yield (109 mg).

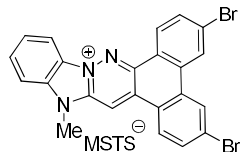
¹H NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 9.99 (s, 1H), 9.35-8.97 (m, 3H), 8.72-8.67 (m, 2H), 8.28-8.17 (m, 2H), 8.00-7.66 (m, 4H), 6.68 (s, 2H), 4.40 (s, 3H), 2.40 (s, 6H), 2.11 (s, 3H)

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3434, 3033, 1603, 1479, 1392, 1213, 1179, 1082, 1011, 768

HRMS (ESI-TOF) for $C_{23}H_{15}BrN_3^+$ m/z (Calc.): 412.0444, m/z (Found): 412.0439

m.p: > 330°C

3,6-Dibromo-15-methyl-15H-dibenzo[f,h]benzo[4,5]imidazo[1,2-b]cinnolin-10-ium 2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (26)



Following the general procedure for Aza-Westphal condensation, 3,6-dibromophenanthrene-9,10-dione (70.6 mg, 0.19 mmol) and Sodium Acetate (16 mg, 0.19 mmol) were added to a suspension of the azolium salt **15** (57 mg, 0.16 mmol) in EtOH (5 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 6 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature. Removal of solvent in vacuo gave a residue that was triturated with cooled water and filtered. The residue was washed with cooled water and AcOEt several times to give a solid that was solved in the minimum amount of MeOH and cool Et₂O was added in an ice bath until precipitation. The solid was filtered to give the desired compound with 81% yield (90 mg).

¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆) δ 9.99 (s, 1H), 8.94-8.75 (m, 5H), 8.32 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8.11-7.89 (m, 4H) 6.66 (s, 2H), 4.44 (s, 3H), 2.43 (s, 6H), 2.12 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆) δ 143.3, 139.00, 135.9, 135.4, 132.7, 132.2, 131.1, 130.5, 129.4, 128.7, 128.0, 127.2, 127.0, 126.8, 126.5, 125.7, 124.5, 124.5, 113.5, 113.2, 112.7, 30.9, 22.3, 19.9.

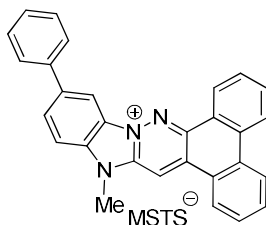
IR (KBr) ν cm⁻¹: 3472, 3073, 1592, 1481, 1385, 1210, 1186, 1014, 850, 676

HRMS (ESI-TOF) for C₂₃H₁₄Br₂N₃⁺ *m/z* (Calc.): 489.9549, *m/z* (Found): 489.9548

m.p: > 330°C

**15-Methyl-12-phenyl-15*H*-dibenzo[*f,h*]benzo[4,5]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium
trimethylbenzenesulfonate (31)**

2,4,6-



Following the general procedure for Aza-Westphal condensation, 9,10-phenanthrenequinone (55 mg, 0.26 mmol) and Sodium Acetate (21 mg, 0.26 mmol) were added to a suspension of the azolium salt **34** (100 mg, 0.22 mmol) in EtOH (5 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 24 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature. Removal of solvent in vacuo gave a residue that was triturated with cooled water and filtered. The residue was washed with cooled water and AcOEt several times to give a solid that was solved in the minimum amount of MeOH and cool Et₂O was added in an ice bath until precipitation. The solid was filtered to give the desired compound with 92% yield (124 mg).

¹H NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 9.96 (s, 1H), 9.25 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 9.08–8.93 (m, 2H), 8.72–8.66 (m, 2H), 8.37 (dddd, *J* = 16.7, 16.0, 5.1, 2.3 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.93 – 7.74 (m, 4H), 7.66 – 7.46 (m, 3H), 6.67 (s, 2H), 4.42 (s, 3H), 2.44 (s, 6H), 2.12 (s, 3H).

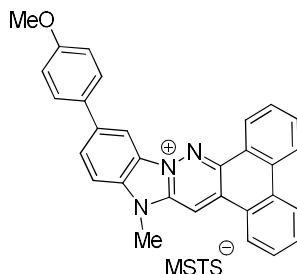
¹³C NMR (125 MHz, DMSO d₆) δ 142.4, 137.9, 137.7, 135.6, 135.5, 135.3, 132.2, 132.0, 131.9, 129.2, 128.7, 127.0, 113.0, 22.2, 19.7.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3438, 3050, 1603, 1483, 1219, 1189, 1084, 1016, 761, 674

HRMS (ESI-TOF) for C₂₉H₂₀N₃⁺ *m/z* (Calc.): 410.1652, *m/z* (Found): 410.1656

m.p.: > 330°C

**12-(4-Methoxyphenyl)-15-methyl-15*H*-dibenzo[*f,h*]benzo[4,5]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium
2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (32)**



Following the general procedure for Aza-Westphal condensation, 9,10-phenanthrenequinone (102 mg, 0.49 mmol) and Sodium Acetate (40.2 mg, 0.49 mmol) were added to a suspension of the azolium salt **35** (193 mg, 0.41 mmol) in EtOH (6 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 24 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature. Removal of solvent in vacuo gave a residue that was triturated with cooled water and filtered. The residue was washed with cooled water and AcOEt several times to give a solid that was solved in the minimum amount of MeOH and cool Et₂O was added in an ice bath until precipitation. The solid was filtered to give the desired compound with 93% yield (244 mg).

¹H NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 10.10 (s, 1H), 9.46 – 9.40 (m, 1H), 9.19 – 9.00 (m, 2H), 8.92 – 8.75 (m, 2H), 8.43 – 8.28 (m, 2H), 8.03 – 7.83 (m, 6H), 7.28 – 7.07 (m, 2H), 6.70 (s, 2H), 4.46 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 2.19 (s, 3H).

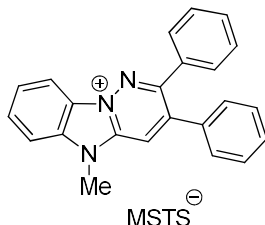
IR (KBr) ν cm⁻¹: 3041, 1607, 1491, 1391, 1265, 1213, 1186, 820, 767, 675

HRMS (ESI-TOF) for C₃₀H₂₂N₃O⁺ m/z (Calc.): 440.1757, m/z (Found): 440.1760

m.p: > 330°C

**5-Methyl-2,3-diphenyl-5H-benzo[4,5]imidazo[1,2-b]pyridazin-10-ium
trimethylbenzenesulfonate**

2,4,6-



Following the general procedure for Aza-Westphal condensation, diphenylethanedione (43 mg, 0.20 mmol) and Sodium Acetate (17 mg, 0.20 mmol) were added to a suspension of the azolium salt **15** (60 mg, 0.17 mmol) in EtOH (6 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 72 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature. Removal of solvent in vacuo gave a residue that was triturated with cooled water and filtered. The residue was washed with cooled water and AcOEt several times to give a solid that was solved in the minimum amount of MeOH and cool Et₂O was added in an ice bath until precipitation. The solid was filtered to give the desired compound with 62% yield (55 mg).

¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆) δ 9.14 (s, 1H), 8.51 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H) 8.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.99 (t, *J* = 7.5, 8.4 Hz, 1H), 7.85 (t, *J* = 8.1, 7.5, 1H) 7.51-7.36 (m, 10H), 6.70 (s, 2H), 4.34 (s, 3H), 2.46 (s, 6H), 2.14 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆) δ 155.0, 142.2, 141.7, 139.1, 135.7, 135.3, 134.7, 133.6, 131.9, 129.6, 129.6, 129.3, 129.0, 128.2, 128.0, 127.0, 125.9, 120.4, 112.9, 112.8, 30.7, 22.3, 19.8.

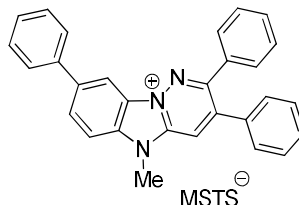
IR (KBr) ν cm⁻¹: 3440, 3054, 1638, 1604, 1466, 1379, 1196, 1083, 1016, 765, 702, 675

HRMS (ESI-TOF) for C₂₃H₁₈N₃⁺ *m/z* (Calc.): 336.1495, *m/z* (Found): 336.1500

m.p: 198-200°C

**5-Methyl-2,3,8-triphenyl-5H-benzo[4,5]imidazo[1,2-b]pyridazin-10-ium
trimethylbenzenesulfonate (38)**

2,4,6-



Following the general procedure for Aza-Westphal condensation, diphenylethanedione (74 mg, 0.35 mmol) and Sodium Acetate (29 mg, 0.35 mmol) were added to a suspension of the azolium salt **34** (128 mg, 0.30 mmol) in EtOH (4 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 24 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature. Removal of solvent in vacuo gave a residue that was triturated with cooled water and filtered. The residue was washed with cooled water and AcOEt several times to give a solid that was solved in the minimum amount of MeOH and cool Et₂O was added in an ice bath until precipitation. The solid was filtered to give the desired compound with 58% yield (104 mg).

¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆) δ 9.13 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.32 (s, 2H), 7.91 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.56-7.36 (m, 13H), 6.67 (s, 2H), 4.36 (s, 3H), 2.45 (s, 6H), 2.13 (s, 3H)

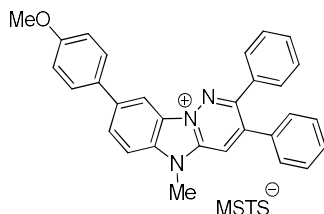
¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆) δ 154.8, 142.0, 141.4, 139.1, 137.9, 137.6, 135.4, 135.1, 134.5, 133.4, 131.2, 129.4, 129.2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.5, 128.0, 127.8, 127.7, 127.5, 126.7, 120.3, 113.3, 109.7, 30.8, 22.2, 19.8.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3422, 2927, 1604, 1481, 1214, 1185, 1015, 767, 700, 676

HRMS (ESI-TOF) for C₂₉H₂₂N₃⁺ *m/z* (Calc.): 412.1808, *m/z* (Found): 412.1811

m.p: 235-238°C

**8-(4-Methoxyphenyl)-5-methyl-2,3-diphenyl-5H-benzo[4,5]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-10-ium
2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (39)**



Following the general procedure for Aza-Westphal condensation, diphenylethanedione (81 mg, 0.38 mmol) and Sodium Acetate (31 mg, 0.38 mmol) were added to a suspension of the azolium salt **35** (150 mg, 0.32 mmol) in EtOH (5 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 24 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature. Removal of solvent in vacuo gave a residue that was triturated with cooled water and filtered. The residue was washed with cooled water and AcOEt several times to give a solid that was solved in the minimum amount of MeOH and cool Et₂O was added in an ice bath until precipitation. The solid was filtered to give the desired compound with 54% yield (111 mg).

¹H NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 9.12 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.29 (s, 2H), 7.88 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 7.56–7.33 (m, 10H), 7.09 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H), 6.69 (s, 2H), 4.34 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 2.45 (s, 6H), 2.13 (s, 3H).

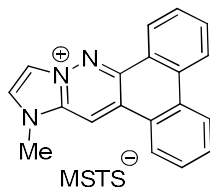
¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 158.9, 154.7, 141.3, 139.0, 137.8, 135.4, 135.3, 135.1, 134.9, 134.6, 134.5, 133.4, 130.7, 129.9, 129.4, 129.3, 129.0, 128.8, 128.6, 128.3, 128.0, 127.8, 127.6, 120.2, 114.0, 113.1, 108.9, 54.8, 30.7, 22.2, 19.8.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3062, 2924, 1606, 1489, 1248, 1196, 1015, 829, 700, 676

HRMS (ESI-TOF) for C₃₀H₂₄N₃O⁺ *m/z* (Calc.): 442.1914, *m/z* (Found): 442.1918

m.p.: 267–272°C

13-Methyl-13*H*-dibenzo[*f,h*]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium 2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (14)



Following the general procedure for Aza-Westphal condensation, 9,10-phenanthrenequinone (40 mg, 0.19 mmol) and Sodium Acetate (16 mg, 0.19 mmol) were added to a suspension of the azolium salt **16** (50 mg, 0.16 mmol) in EtOH (4 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 24 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature. Removal of solvent in vacuo gave a residue that was triturated with cooled water and filtered. The residue was washed with cooled water and AcOEt several times to give a solid that was solved in the minimum amount of MeOH and cool Et₂O was added in an ice bath until precipitation. The solid was filtered to give the desired compound with 53% yield (41 mg).

¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆) δ 9.82 (s, 1H), 8.92-8.81 (m, 3H), 8.6 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 7.86-7.74 (m, 4H), 6.67 (s, 2H), 4.26 (s, 3H), 2.46 (s, 6H), 2.12 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆) δ 144.6, 142.3, 135.6, 135.3, 134.4, 131.5, 131.2, 130.9, 129.3, 129.2, 128.2, 128.1, 125.3, 125.2, 124.8, 124.5, 123.9, 123.4, 123.2, 123.1, 117.0, 34.1, 22.2, 19.7.

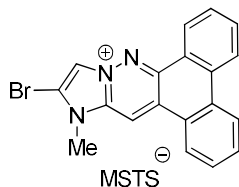
IR (KBr) ν cm⁻¹: 3434, 3053, 1631, 1450, 1384, 1188, 1085, 1014, 762, 677

HRMS (ESI-TOF) for C₁₉H₁₄N₃⁺ *m/z* (Calc.): 284.1182, *m/z* (Found): 284.1179

m.p: 118-122°C

**12-Bromo-13-methyl-13*H*-dibenzo[*f,h*]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium
trimethylbenzenesulfonate (25)**

2,4,6-



Following the general procedure for Aza-Westphal condensation, 9,10-phenanthrenequinone (33 mg, 0.16 mmol) and Sodium Acetate (14 mg, 0.16 mmol) were added to a suspension of the azolium salt **24** (50 mg, 0.13 mmol) in EtOH (4 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 24 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature. Removal of solvent in vacuo gave a residue that was triturated with cooled water and filtered. The residue was washed with cooled water and AcOEt several times to give a solid that was solved in the minimum amount of MeOH and cool Et₂O was added in an ice bath until precipitation. The solid was filtered to give the desired compound with 64% yield (47 mg).

¹H NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 9.90 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.94 (d, J = 8 Hz, 1H), 8.79 (d, J = 8 Hz, 1H), 8.69 (d, J = 8 Hz, 2H), 7.89-7.75 (m, 4H), 6.68 (s, 2H), 4.22 (s, 3H), 2.46 (s, 6H), 2.13 (s, 3H)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO d₆) δ 144.9, 141.9, 135.8, 135.6, 135.2, 131.7, 131.5, 131.2, 129.6, 129.1, 128.4, 128.3, 126.0, 125.4, 124.8, 124.6, 124.0, 123.7, 123.5, 117.9, 116.9, 113.0, 33.0, 22.2, 19.8.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3406, 1389, 1200, 1097, 1025, 770, 684

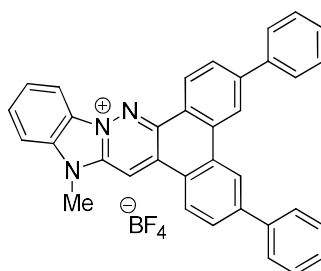
HRMS (ESI-TOF) for C₁₉H₁₃BrN₃⁺ m/z (Calc.): 362.0287, m/z (Found): 362.0283

m.p: 250-253°C (decomposition)

General procedure for Suzuki coupling

A suspension of compound **25** or **26** (1 eq), boronic acid (2 eq), potassium fluoride (4 eq) and [1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocene]dichloropalladium(II) complex with dichloromethane (1:1) (0.06 eq) in a mixture of DME, MeOH and water (2:1:1) was stirred and heated under reflux between 24 and 36 hours. After this time the reaction was cooled to room temperature and MeOH was added. The reaction mixture was filtered and washed with MeOH. The filtrate was concentrated in vacuo to approximately ¼ of its original volume. It was poured into aqueous NaBF₄ saturated solution to change the counter ion. The mixture is stirred for 4 hours and after this time the mixture is filtered to obtain a solid residue. A flash column chromatography (98:2→95:5 CH₂Cl₂/MeOH) in silica was performed to this residue to obtain the desired compound.

15-Methyl-3,6-diphenyl-15*H*-dibenzo[*f,h*]benzo[4,5]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium 2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (**33**)



Following the general procedure for Suzuki coupling reaction, a suspension of compound **26** (67 mg, 0.1 mmol), boronic acid (24 mg, 0.2 mmol), potassium fluoride (47 mg, 0.8 mmol) and [1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocene]dichloropalladium(II) complex with dichloromethane (1:1) (5 mg, 0.006 mmol) in a mixture of DME, MeOH and water (2:1:1) (8 ml) was stirred and heated under reflux 8 hours. After this time the reaction was cooled to room temperature and MeOH was added. The reaction mixture was filtered and washed with MeOH. The filtrate was concentrated in vacuo to approximately ¼ of its original volume. It was poured into aqueous NaBF₄ saturated solution to change the counter ion. The mixture is stirred for 4 hours and after this time the mixture is filtered to obtain a solid residue. A flash column chromatography (98:2→95:5 CH₂Cl₂/MeOH) in silica was performed to this residue to obtain the desired compound with 61% yield (35 mg).

^1H NMR (500 MHz, DMSO d_6) δ 9.98 (s, 1H), 9.15 (d, J = 8.3 Hz 1H), 9.07-9.00 (m, 3H), 8.76 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.25 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.10-7.86 (m, 8H), 7.60-7.49 (m 6H), 4.39 (s, 3H)

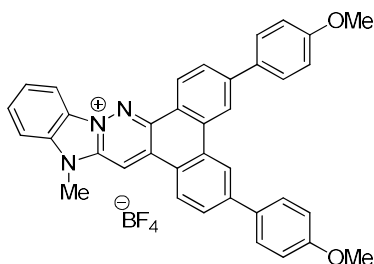
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6) δ 144.7, 144.5, 144.3, 139.9, 139.3, 139.0, 138.9, 133.4, 132.8, 131.9, 131.1, 130.3, 129.6, 129.5, 129.2, 129.0, 128.2, 128.0, 127.8, 126.4, 126.1, 125.1, 124.9, 122.8, 114.2, 113.4, 113.1, 31.5.

IR (KBr) ν cm^{-1} : 3061, 1632, 1604, 1483, 1387, 1330, 1062, 765

HRMS (ESI-TOF) for $\text{C}_{35}\text{H}_{24}\text{N}_3^+$ m/z (Calc.): 486.1965, m/z (Found): 486.1966

m.p: 213-217°C (decomposition)

3,6-Bis(4-methoxyphenyl)-15-methyl-15H-dibenzo[*f,h*]benzo[4,5]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium 2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (34)



Following the general procedure for Suzuki coupling reaction, a suspension of compound **26** (60 mg, 0.08 mmol), boronic acid (26.4 mg, 0.17 mmol), potassium fluoride (40 mg, 0.7 mmol) and [1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocene]dichloropalladium(II) complex with dichloromethane (1:1) (5 mg, 0.005 mmol) in a mixture of DME, MeOH and water (2:1:1) (6 ml) was stirred and heated under reflux 8 hours. After this time the reaction was cooled to room temperature and MeOH was added. The reaction mixture was filtered and washed with MeOH. The filtrate was concentrated in vacuo to approximately ¼ of its original volume. It was poured into aqueous NaBF_4 saturated solution to change the counter ion. The mixture is stirred for 4 hours and after this time the mixture is filtered to obtain a solid residue. A flash column chromatography (98:2→95:5 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) in silica was performed to this residue to obtain the desired compound with 73% yield (37 mg).

^1H NMR (500 MHz, DMSO d_6) δ 9.88 (s, 1H), 9.12-8.65 (m, 5H), 8.22 (s, 1H), 8.06-7.84 (m, 8H), 7.10 (s, 4H), 4.38 (s, 3H), 3.85 (s, 6H)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO d_6) δ 159.4, 143.7, 142.9, 142.7, 138.7, 132.3, 131.6, 130.8, 130.3, 130.0, 129.3, 128.3, 128.1, 126.8, 126.3, 125.3, 125.0, 123.2, 120.6, 120.3, 113.9, 113.7, 113.1, 112.4, 111.5, 54.8, 30.5

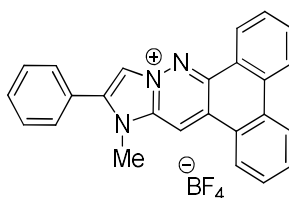
IR (KBr) ν cm^{-1} : 3482, 1630, 1601, 1571, 1330, 1251, 1184, 1059, 1031, 824, 755

HRMS (ESI-TOF) for $\text{C}_{37}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2^+$ m/z (Calc.): 546.2176, m/z (Found): 546.2171

m.p: 215-220°C (decomposition)

13-Methyl-12-phenyl-13H-dibenzo[f,h]imidazo[1,2-b]cinnolin-10-ium
trimethylbenzenesulfonate (35)

2,4,6-



Following the general procedure for Suzuki coupling reaction, a suspension of compound **25** (70 mg, 0.12 mmol), phenylboronic acid (30.3 mg, 0.24 mmol), potassium fluoride (29 mg, 0.48 mmol) and [1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocene]dichloropalladium(II) complex with dichloromethane (1:1) (6 mg, 0.0072 mmol) in a mixture of DME, MeOH and water (2:1:1) was stirred and heated under reflux between 24 hours. After this time the reaction was cooled to room temperature and MeOH was added. The reaction mixture was filtered and washed with MeOH. The filtrate was concentrated in vacuo to approximately $\frac{1}{4}$ of its original volume. It was poured into aqueous NaBF_4 saturated solution to change the counter ion. The mixture is stirred for 4 hours and after this time the mixture is filtered to obtain a solid residue. A flash column chromatography (98:2 \rightarrow 95:5 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) in silica was performed to this residue to obtain the desired compound with 25% yield (14 mg).

^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6) δ 9.99 (s, 1H), 9.34 (s, 1H), 9.04 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.96 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.79 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.97-7.81 (m, 6H), 7.74-7.72 (m, 3H), 4.27 (s, 3H)

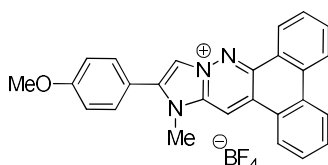
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6) δ 146.0, 139.9, 136.4, 132.7, 132.4, 132.1, 131.6, 130.5, 130.3, 129.9, 129.4, 129.3, 126.7, 126.4, 126.0, 125.7, 125.4, 125.0, 124.7, 124.4, 116.4, 114.0, 33.5

IR (KBr) ν cm^{-1} : 3466, 1632, 1482, 1451, 1386, 1075, 1037, 770, 756

HRMS (ESI-TOF) for C₂₅H₁₈N₃⁺ m/z (Calc.): 360.1495, m/z (Found): 360.1496

m.p: 140-145°C (decomposition)

12-(4-Methoxyphenyl)-13-methyl-13*H*-dibenzo[*f,h*]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium 2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (36)



Following the general procedure for Suzuki coupling reaction, a suspension of compound **25** (100 mg, 0.18 mmol), boronic acid (54 mg, 0.36 mmol), potassium fluoride (41 mg, 0.71 mmol) and [1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocene]dichloropalladium(II) complex with dichloromethane (1:1) (9 mg, 0.011 mmol) in a mixture of DME, MeOH and water (2:1:1) was stirred and heated under reflux for 24 hours. After this time the reaction was cooled to room temperature and MeOH was added. The reaction mixture was filtered and washed with MeOH. The filtrate was concentrated in vacuo to approximately ¼ of its original volume. It was poured into aqueous NaBF₄ saturated solution to change the counter ion. The mixture is stirred for 4 hours and after this time the mixture is filtered to obtain a solid residue. A flash column chromatography (98:2→95:5 CH₂Cl₂/MeOH) in silica was performed to this residue to obtain the desired compound with 38% yield (32 mg).

¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆) δ 9.85 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.85 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 8.72 (s, 2H), 7.88-7.72 (m, 6H), 7.28 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.24 (s, 3H), 3.92 (s, 3H)

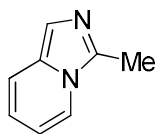
¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆) δ 164.6, 148.6, 142.7, 138.9, 135.3, 135.0, 134.7, 134.6, 133.2, 132.0, 131.9, 129.1, 128.9, 128.8, 128.4, 127.7, 127.3, 127.1, 120.1, 118.5, 118.1, 116.5, 58.8, 36.2.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3426, 1601, 1505, 1383, 1258, 1181, 1034, 764, 721

HRMS (ESI-TOF) for C₂₆H₂₀N₃O⁺ m/z (Calc.): 390.1601, m/z (Found): 390.1599

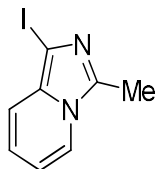
m.p: 144-148°C (decomposition)

3-Methylimidazo[1,5-a]pyridine (**44**)²⁴⁸



Acetic anhydride (8.2 ml) was added to a mixture of 2-aminomethylpyridine (1.56 ml 15.1 mmol) and p-toluensulfonic acid (2.9 g 15.1 mmol). The mixture was refluxed and after 8 hours the reaction was cooled down and was slowly poured into 20% NaOH solution in water in an ice bath. The resulting suspension was extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with water and dried with Na₂SO₄. Flash column chromatography was performed (98:2 CH₂Cl₂/MeOH) to give the desired product as a dark yellow oil with 98% yield (1.9 g).

1-Iodo-3-methylimidazo[1,5-a]pyridine (**45**)



N-iodosuccinimide (225 mg, 1 mmol) was added to a solution of compound **44** (123.8 mg, 0.94 mmol) in a mixture of anhydrous CH₂Cl₂ (8 ml) and anhydrous DMF (4 ml). After stirring 1.5 hours at room temperature the reaction was quenched with water and was extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with brine and a saturated solution of Na₂S₂O₃. The organic layer is dried with Na₂SO₄. No further purification was needed. The desired compound was obtained with 89% yield (216.3 mg)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.51 (dtap, *J* = 7.1, 1.2 Hz, 1H), 7.10 (dtap, *J* = 9.2, 1.25 Hz, 1H), 6.59 (ddd, *J* = 9.2, 6.4, 1 Hz, 1H), 6.54-6.41 (m, 1H), 2.52 (s, 3H).

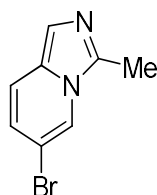
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 136.8, 131.9, 120.8, 118.9, 118.1, 112.9, 70.2, 12.4.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 2920.82, 1648.22, 1629.59, 1082.62, 743.68

HRMS (ESI-TOF) for C₈H₇IN₂ *m/z* (Calc.): 258.9712 *m/z* (found) 258.9710

m.p: 61-67°C

6-Bromo-3-methylimidazo[1,5-a]pyridine (**48**)²⁶⁹

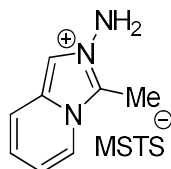


Acetic anhydride (10 ml) was added to a mixture of 5-Bromo-2-aminomethylpyridine (345 mg, 1.84 mmol) and p-toluensulfonic acid (350.4 mg, 1.84 mg). The mixture was refluxed, and after 24 hours the reaction was cooled down. The reaction mixture was poured into 20% NaOH solution in water, in an ice bath. The resulting suspension was extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with water and dried with Na₂SO₄. Flash column chromatography was performed (98:2 CH₂Cl₂/MeOH) to give the desired product with 97% yield (376.7 mg).

General procedure for N-amination of Heterocycles.

A solution of MSH (0.75 mmol, 1.5 eq) in dry CH₂Cl₂ (3 ml) was added dropwise to a solution of the starting heterocycle (0.5 mmol, 1 eq) in dry CH₂Cl₂ (3 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature between 5 and 24 hours. After this time the reaction mixture was filtered, the solid phase was isolated and washed with CH₂Cl₂ and petroleum ether to give the desired product.

2-Amino-3-methylimidazo[1,5-a]pyridin-2-ium 2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (**42**)



Following the general procedure for N-amination of heterocycles a solution of MSH (242 mg, 1.12 mmol) in CH₂Cl₂ (4 ml) was added dropwise to a solution of **44** (99 mg, 0.74 mmol) in CH₂Cl₂ (4 ml). The reaction mixture was stirred for 5 hours. After this time the product was isolated to obtain the desired product with 67% yield (172 mg).

¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆) δ 8.37 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.72 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.30-7.15 (m, 3H), 7.09 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 6.70 (s, 2H), 2.80 (s, 3H), 2.47 (s, 6H) 2.14 (s, 3H).

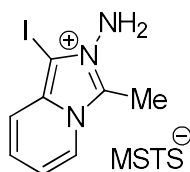
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6) δ 142.1, 135.7, 135.3, 132.9, 129.3, 125.9, 123.1, 122.4, 117.2, 115.6, 112.0, 22.2 (2C), 19.77, 7.84.

IR (KBr) ν cm^{-1} : 3254, 3053, 2926, 1646, 1559, 1379, 1081, 860, 679

HRMS (ESI-TOF) for $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_3^+$ m/z (Calc.): 148.0857, m/z (found): 148.0859

m.p: 241-244°C

2-Amino-1-iodo-3-methylimidazo[1,5-*a*]pyridin-2-ium 2,4,6-trimethylbenzenesulfonate (49)



Following the general procedure for N-amination of heterocycles a solution of MSH (1211.9 mg, 5.63 mmol) in CH_2Cl_2 (8 ml) was added dropwise to a solution of **45** (968.5 mg, 3.75 mmol) in CH_2Cl_2 (8 ml). The reaction mixture was stirred for 24 hours. After this time the product was isolated to obtain the desired product with 62% yield (1110 mg).

^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6) δ 8.40 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.26-7.09 (m, 2H), 6.89 (s, 2H), 6.70 (s, 2H), 2.89 (s, 3H), 2.46 (s, 6H), 2.14 (s, 3H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6) δ 142.3, 137.1, 135.7, 135.3, 129.3, 124.4, 123.7, 117.7, 116.4, 73.4, 22.3 (2C), 19.8, 9.3.

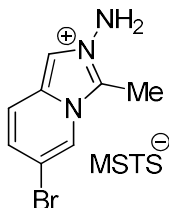
IR (KBr) ν cm^{-1} : 3273, 1206, 1193, 1083, 1015, 674.

HRMS (ESI-TOF) for $\text{C}_8\text{H}_9\text{IN}_3^+$ m/z (Calc.): 273.9836, m/z (Found): 273.9814

m.p: 208-213°C

2-Amino-6-bromo-3-methylimidazo[1,5-*a*]pyridin-2-ium
(51)

2,4,6-trimethylbenzenesulfonate



Following the general procedure for N-amination of heterocycles a solution of MSH (236.5 mg, 1.1 mmol) in CH₂Cl₂ (3 ml) was added dropwise to a solution of **48** (154.6 mg, 0.73 mmol) in CH₂Cl₂ (3 ml). The reaction mixture was stirred for 7 hours. After this time the product was isolated to obtain the desired product with 77% yield (238.2 mg).

¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆) δ 8.82 (dd, *J* = 2.4, 1.1 Hz 1H), 8.09 (d, *J* = 0.7 Hz 1H), 7.72 (dd, *J* = 9.8, 1.1 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 9.8, 1.5 Hz, 1H), 7.25 (s, 2H), 6.72 (s, 2H), 2.79 (s, 3H), 2.47 (s, 6H), 2.15 (s, 3H).

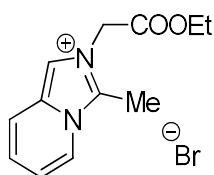
¹³C NMR (126 MHz, DMSO d₆) δ 142.3, 135.7, 135.3, 133.4, 129.3, 126.5, 124.4, 122.5, 118.6, 113.2, 110.5, 22.3 (2C), 19.8, 8.1.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3485, 3244, 3151, 1656, 1167, 1083, 862, 679.

HRMS (ESI-TOF) for C₈H₉BrN₃⁺ *m/z* (Calc.): 225.9981, *m/z* (Found): 225.9980

m.p: 177-180°C

2-(2-Ethoxy-2-oxoethyl)-3-methylimidazo[1,5-*a*]pyridin-2-ium bromide (43)



Ethyl bromoacetate (0.081 ml, 0.75 mmol) was added to a solution of **44** (88.1 mg, 0.67 mmol) in dry acetone (2 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 4 hours. After that time the reaction mixture is cooled down to room temperature and filtered to

obtain a pale brown solid. This solid has been washed several times with acetone and Et₂O to give the desired product with 60% yield (120 mg).

¹H NMR (300 MHz, DMSO d₆) δ 8.48 (dd, *J* = 7.1, 1.1 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 0.9 Hz 1H), 7.86 (dd, *J* = 9.0, 1.1 Hz, 1H), 7.35-7.09 (m, 2H), 5.58 (s, 2H), 4.22 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.32 (s, 3H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆) δ 165.8, 135.3, 127.5, 123.5, 122.5, 117.8, 116.5, 113.3, 61.7, 48.9, 13.4, 8.6.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3106, 2907, 1737, 1655, 1226, 1026, 748, 439

HRMS (ESI-TOF) for C₁₂H₁₅N₂O₂⁺ *m/z* (Calc.): 219.1125, *m/z* (Found): 219.1127

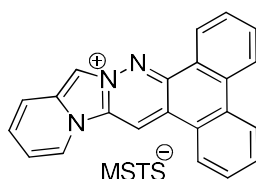
m.p: 212-218°C

General procedure for Aza-Westphal condensation

9,10-phenantroquinone (0.72 mmol 1.2 eq) and Sodium Acetate (0.72 mmol, 1.2 eq) were added to a suspension of the azolium salt (0.6 mmol, 1 eq) in EtOH (6 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux between 24 and 48 hours. After this time the reaction mixture was cooled down to room temperature. Removal of solvent in vacuo gave a residue that was triturated with cooled water and filtered. The residue was washed with cooled water and AcOEt several times to give a solid that was solved in the minimum amount of MeOH and cool Et₂O was added in an ice bath until precipitation. The solid was filtered to give the desired compound.

Dibenzo[*f,h*]pyrido[1',2':3,4]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium trimethylbenzenesulfonate (40)

2,4,6-



Following the general procedure for Aza-Westphal condensation, 9,10-phenantroquinone (43.2 mg, 0.21 mmol) and Sodium Acetate (17 mg, 0.21 mmol) were added to a suspension of

42 (60 mg, 0.17 mmol) in EtOH (4 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 24 hours. After this time the product was isolated with 50% yield (44.2 mg).

^1H NMR (500 MHz, DMSO d_6) δ 10.52 (s, 1H), 9.53 (dd, J = 6.9, 0.7 Hz, 1H), 9.34 (s, 1H), 8.95 (dd, J = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 8.81 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.72-8.70 (m, Hz, 2H), 8.19 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.91-7.87 (m, 1H), 7.84-7.77 (m, 4H), 7.58 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 6.70 (s, 2H), 2.47 (s, 6H), 2.13 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO d_6) δ 146.3, 142.3, 135.6, 135.3, 131.9, 131.8, 131.7, 130.4, 129.9, 129.2, 128.9, 128.4, 128.3, 127.7, 125.4, 124.9, 124.7, 124.5, 124.3, 123.7, 123.4, 121.5, 117.2, 115.7, 113.8, 108.6, 22.2 (2C), 19.7.

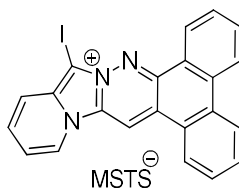
IR (KBr) ν cm^{-1} : 3044, 1648, 1602, 1519, 1446, 1318, 1187, 1085, 758, 677

HRMS (ESI-TOF) for $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_3^+$ m/z (Calc.): 320.1182, m/z (Found): 320.1159

m.p: 177-179°C

11-Iododibenzo[*f,h*]pyrido[1',2':3,4]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium
trimethylbenzenesulfonate (50)

2,4,6-



Following the general procedure for Aza-Westphal condensation, 9,10-phenantroquinone (157 mg, 0.76 mmol) and Sodium Acetate (62 mg, 0.76 mmol) were added to a suspension of **49** (300 mg, 0.63 mmol) in EtOH (9 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 24 hours. After this time the product was isolated with 67% yield (272.1 mg).

^1H NMR (500 MHz, DMSO d_6) δ 10.54 (s, 1H), 9.58 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 9.07 (dd, J = 8.1, 1.5 Hz, 1H), 8.87-8.85 (m, 1H), 8.78-8.75 (m, 2H), 8.12 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.97 – 7.79 (m, 5H), 7.65 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 6.70 (s, 2H), 2.46 (s, 6H), 2.14 (s, 3H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6) δ 146.2, 142.3, 135.6, 135.3, 134.9, 132.0, 131.8, 131.3, 130.6, 130.1, 129.3, 129.1, 128.5, 125.9, 125.3, 124.7, 124.3, 123.8, 123.6, 121.8, 117.4, 116.4, 113.7, 67.7, 22.2 (2C), 19.8.

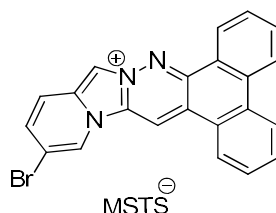
IR (KBr) ν cm^{-1} : 3435, 1642, 1516, 1492, 1379, 1212, 1182, 1013, 760, 676

HRMS (ESI-TOF) for $\text{C}_{22}\text{H}_{13}\text{N}_3^+$ m/z (Calc.): 446.0149, m/z (Found): 446.0114

m.p: 201-206°C

14-Bromodibenzo[*f,h*]pyrido[1',2':3,4]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium
trimethylbenzenesulfonate (52)

2,4,6-



Following the general procedure for Aza-Westphal condensation, 9,10-phenantroquinone (23.4 mg, 0.11 mmol) and Sodium Acetate (9 mg, 0.11 mmol) were added to a suspension of **51** (40 mg, 0.093 mmol) in EtOH (3 ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 48 hours. After this time the product was isolated with 73% yield (40.7 mg).

^1H NMR (300 MHz, DMSO d_6) δ 10.55 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 9.40 (s, 1H), 9.01 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.78-8.76 (m, 2H), 8.18 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 7.99-7.79 (m, 5H), 6.69 (s, 2H), 2.45 (s, 6H), 2.13 (s, 3H).

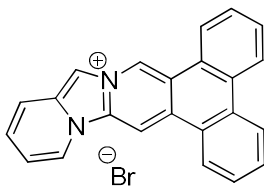
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6) δ 146.7, 135.6, 135.3, 132.6, 132.1, 131.9, 130.8, 130.1, 129.2, 128.6, 128.5, 127.7, 125.3, 124.8, 124.7, 124.5, 124.4, 123.9, 123.6, 122.4, 118.5, 114.0, 110.0, 109.5, 22.2 (2C), 19.8.

IR (KBr) ν cm^{-1} : 3441, 3040, 1645, 1514, 1492, 1384, 1084, 1014, 761, 677

HRMS (ESI-TOF) for $\text{C}_{22}\text{H}_{13}\text{BrN}_3^+$ m/z (Calc.): 400.0287, m/z (Found): 400.0289

m.p: 260-270°C

Dibenzo[*f,h*]pyrido[1',2':3,4]imidazo[1,2-*b*]isoquinolin-16-ium bromide (**41**)



9,10-phenantroquinone (84 mg, 0.4 eq) and Et₃N (0.055 ml, 0.4 eq) were added to a suspension of **43** (120 mg, 0.4 eq) in EtOH (5ml). The reaction mixture was stirred and heated under reflux for 24h. After this time the removal of the solvent in vacuo gave a residue that was triturated with Et₂O. The residue was washed with Et₂O and cold acetone. A flash column chromatography (98:2 CH₂Cl₂/MeOH) in alumina was performed to obtain the desired product as a yellow solid with 30% yield (47.5 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 10.51 (s, 1H), 9.92 (s, 1H), 9.48 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.71-8.48 (m, 4H), 8.01 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.75-7.51 (m, 5H), 7.25 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO d₆) δ 152.2, 146.6, 142.1, 138.8, 135.9, 135.5, 133.9, 133.3, 132.9, 132.1, 131.6, 129.4, 129.2, 128.9, 128.7, 126.5, 126.3, 125.8, 125.1, 124.5, 124.3, 123.9, 123.7, 122.3, 119.7, 22.3 (2C), 19.9.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3397, 3026, 1654, 1534, 1427, 1220, 750, 717

HRMS (ESI-TOF) for C₂₃H₁₅N₂⁺ *m/z* (Calc.): 319.1230, *m/z* (Found): 319.1232

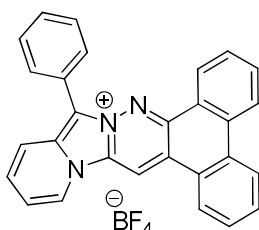
m.p.: > 280°C (decomposition)

General procedure for Suzuki coupling

A suspension of compound **50** or **52** (0.12 mmol, 1 eq), boronic acid (0.24 mmol, 2 eq), potassium fluoride (0.48 mmol, 4 eq) and [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II) complex with dichloromethane (1:1) (0.0072 mmol 0.06 eq) in a mixture of DME, MeOH and water (2:1:1) (4ml) was stirred and heated under reflux between 24 and 36 hours. After this time the reaction was cooled to room temperature and MeOH was added. The reaction mixture was filtered and washed with MeOH. The filtrate was concentrated in vacuo to approximately ¼ of its original volume. It was poured into aqueous NaBF₄ saturated solution to change the counter ion. The mixture is stirred for 4 hours and after

this time the mixture is filtered to obtain a solid residue. A flash column chromatography (98:2→95:5 CH₂Cl₂/MeOH) in silica was performed to this residue to obtain the desired compound.

11-Phenyldibenzo[*f,h*]pyrido[1',2':3,4]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium tetrafluoroborate (53)



Following the general procedure for Suzuki coupling a suspension of compound **50** (100 mg 0.15 mmol), phenylboronic acid (36.6 mg, 0.30 mmol), potassium fluoride (35 mg, 0.6 mmol) and [1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocene]dichloropalladium(II) complex with dichloromethane (1:1) (7.4 mg, 0.009 mmol) in a mixture of DME, MeOH and water (2:1:1) (4ml) was stirred and heated under reflux for 24 hours. After this time the reaction mixture was filtered. The filtrate was poured into NaBF₄ saturated solution. The desired product was isolated to give 36% yield (26.2 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 10.73 (s, 1H), 9.70 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.95 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.90 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.83-8.80 (m, 2H), 8.35 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 8.00-7.65 (m, 9H).

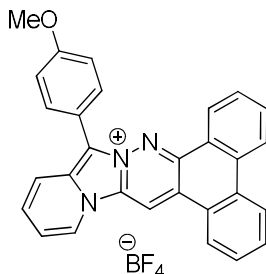
¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆) δ 145.8, 131.9, 131.7, 131.0, 130.5, 129.7, 129.5, 128.9, 128.7, 128.5, 127.3, 125.2, 125.1, 124.8, 124.5, 124.2, 124.1, 123.8, 123.4, 121.5, 117.9, 116.9, 116.6, 113.7.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3433, 1646, 1528, 1490, 1383, 1059, 767, 703

HRMS (ESI-TOF) for C₂₈H₁₈N₃⁺ m/z (Calc.): 396.1484, m/z (Found): 396.1484

m.p: 275-277°C (decomposition)

**11-(4-Methoxyphenyl)dibenzo[*f,h*]pyrido[1',2':3,4]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium
tetrafluoroborate (54)**



Following the general procedure for Suzuki coupling a suspension of compound **50** (140 mg, 0.22 mmol), 4-methoxyphenylboronic acid (67 mg, 0.44 mmol), potassium fluoride (52.1 mg, 0.88 mmol) and [1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocene]dichloropalladium(II) complex with dichloromethane (1:1) (11 mg, 0.013 mmol) in a mixture of DME, MeOH and water (2:1:1) (4 ml) was stirred and heated under reflux for 6 hours. After this time the reaction mixture was filtered. The filtrate was poured into NaBF₄ saturated solution. The desired product was isolated to give 59% yield (67 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.54 (s, 1H), 9.59 (s, 1H), 8.76 (m, 4H), 8.30 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.99–7.62 (m, 6H), 7.37 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.98 (s, 3H).

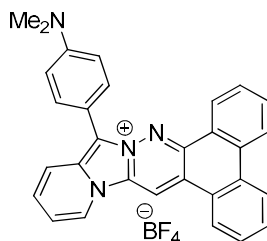
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.0, 145.9, 131.8, 130.3, 129.0, 124.9, 121.2, 118.2, 117.0, 116.0, 114.4, 55.1.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3434, 1644, 1610, 1510, 1382, 1263, 1058, 835, 769, 756

HRMS (ESI-TOF) for C₂₉H₂₀N₃O⁺ *m/z* (Calc.): 426.1576, *m/z* (Found): 426.1577

m.p: 291–292°C (decomposition)

11-(4-(Dimethylamino)phenyl)dibenzo[*f,h*]pyrido[1',2':3,4]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium tetrafluoroborate (55)



Following the general procedure for Suzuki coupling a suspension of compound **50** (124 mg 0.2 mmol), 4-dimethylaminophenylboronic acid (66 mg, 0.4 mmol), potassium fluoride (46.5 mg, 0.8 mmol) and [1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocene]dichloropalladium(II) complex with dichloromethane (1:1) (10 mg, 0.012mmol) in a mixture of DME, MeOH and water (2:1:1) (4ml) was stirred and heated under reflux for 6 hours. After this time the reaction mixture was filtered. The filtrate was poured into NaBF₄ saturated solution. The desired product was isolated to give 41% yield (43.5 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 10.59 (s, 1H), 9.60 (s, 1H), 8.90 (d, 2H), 8.78, (d, 2H), 8.28, (d, 1H), 8.02, (d, 2H), 7.92-7.79 (m, 4H), 7.66 (tap, 2H), 7.09 (d, 2H), 3.12 (s, 6H).

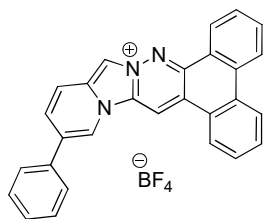
¹³C NMR (126 MHz, DMSO d₆) δ 151.1, 146.4, 132.4, 132.3, 130.0, 129.5, 129.1, 128.9, 127.4, 125.6, 125.5, 124.9, 124.8, 124.4, 119.8, 117.8, 116.7, 112.1, 110.9, 100.6

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3064, 1565, 1409, 1377, 1251, 1216, 1181, 1033, 764, 743

HRMS (ESI-TOF) for C₃₀H₂₃N₄⁺ m/z (Calc.): 439.1917, m/z (Found): 439.1915

m.p: 260-261°C (decomposition)

14-Phenyldibenzo[*f,h*]pyrido[1',2':3,4]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium tetrafluoroborate (56)



Following the general procedure for Suzuki coupling a suspension of compound **52** (70 mg 0.12 mmol), phenylboronic acid (28.5 mg, 0.24 mmol), potassium fluoride (27.9 mg, 0.48 mmol) and [1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocene]dichloropalladium(II) complex with dichloromethane (1:1) (7 mg, 0.007 mmol) in a mixture of DME, MeOH and water (2:1:1) (6 ml) was stirred and heated under reflux for 22 hours. After this time the reaction mixture was filtered. The filtrate was poured into NaBF₄ saturated solution. The desired product was isolated to give 43% yield (25.1 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 10.69 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 9.44 (s, 1H), 9.10 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 9.00-8.75 (m, 3H), 8.43-8.19 (m, 2H), 7.99-7.87 (m, 6H), 7.70-7.58 (m, 3H).

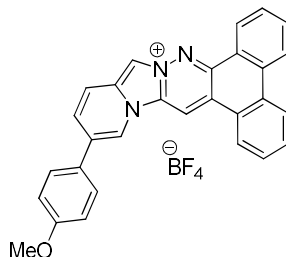
¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆) δ 146.51, 134.17, 131.95, 131.80, 130.87, 130.57, 129.82, 129.12, 128.95, 128.74, 128.39, 128.19, 126.39, 125.40, 124.74, 124.41, 124.24, 123.91, 123.53, 121.68, 121.46, 117.49, 113.85, 108.72.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3452, 1652, 1522, 1491, 1390, 1233, 1084, 764, 702

HRMS (ESI-TOF) for C₂₈H₁₈N₃⁺ *m/z* (Calc.): 396.1495, *m/z* (Found): 396.1495

m.p: 274-276°C (decomposition)

**14-(4-Methoxyphenyl)dibenzo[*f,h*]pyrido[1',2':3,4]imidazo[1,2-*b*]cinnolin-10-ium
tetrafluoroborate (57)**



Following the general procedure for Suzuki coupling a suspension of compound **52** (42 mg 0.07 mmol), 4-methoxyphenylboronic acid (21.3 mg, 0.14 mmol), potassium fluoride (16.3 mg, 0.28 mmol) and [1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocene]dichloropalladium(II) complex with dichloromethane (1:1) (3.4 mg, 0.004 mmol) in a mixture of DME, MeOH and water (2:1:1) (4ml) was stirred and heated under reflux for 7 hours. After this time the reaction mixture was filtered. The filtrate was poured into NaBF₄ saturated solution. The desired product was isolated to give 76% yield (27.2 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.46 (s, 1H), 9.67 (s, 1H), 9.30 (s, 1H), 8.95 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.70-8.68 (m, 3H), 8.22-8.17 (m, 2H), 7.96-7.71 (m, 6H), 7.20 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.7, 146.4, 131.9, 131.7, 130.7, 130.5, 129.8, 129.0, 128.3, 127.9, 127.6, 126.2, 125.3, 124.6, 124.3, 124.1, 123.9, 123.5, 121.4, 120.1, 117.4, 114.4, 113.6, 108.6, 54.9.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 2957, 2927, 2853, 1608, 1507, 1383, 1253, 1084, 762

HRMS (ESI-TOF) for C₂₉H₂₀N₃O⁺ *m/z* (Calc.): 426.1601, *m/z* (Found): 426.1598

m.p: 245-247°C

Bibliografía

-
- (1) Lerman, L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines *J. Mol. Biol.* **1961**, 3 (1) 18-IN14.
- (2) Lerman, L. S. The Structure of the DNA-Acridine Complex *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1963**, 49 (1) 94-102.
- (3) Ihmels, H.;Faulhaber, K.;Vedaldi, D.;Dall'Acqua, F.;Viola, G. Intercalation of Organic Dye Molecules into Double-stranded DNA. Part 2: The Annelated Quinolizinium Ion as a Structural Motif in DNA Intercalators† *Photochem. Photobiol.* **2005**, 81 (5) 1107-1115.
- (4) Paul, A.;Bhattacharya, S. Chemistry and biology of DNA-binding small molecules *Current Science* **2012**, 102 (2) 212-231.
- (5) Suarez, R. M.;Bosch, P.;Sucunza, D.;Cuadro, A. M.;Domingo, A.;Mendicuti, F.;Vaquero, J. J. Targeting DNA with small molecules: a comparative study of a library of azonia aromatic chromophores *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13 (2) 527-538.
- (6) Geierstanger, B. H.;Wemmer, D. E. Complexes of the Minor Groove of DNA *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, 24 (1) 463-493.
- (7) David, E. G.;Luminita, M. V. Intercalative Binding of Small Molecules to Nucleic Acids *Curr. Org. Chem.* **2000**, 4 (9) 915-929.
- (8) Haq, I.;Ladbury, J. Drug-DNA recognition: energetics and implications for design *J. Mol. Recognit.* **2000**, 13 (4) 188-197.
- (9) Brana, M. F.;Cacho, M.;Gradillas, A.;Pascual-Teresa, B. d.;Ramos, A. Intercalators as Anticancer Drugs *Curr. Pharm. Des.* **2001**, 7 (17) 1745-1780.
- (10) Hurley, L. H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2 188.
- (11) Ihmels, H.;Thomas, L. (2011). *Materials Science of DNA*, CRC Press.
- (12) Medhi, C.;Mitchell, J. B. O.;Price, S. L.;Tabor, A. B. Electrostatic factors in DNA intercalation *Biopolymers* **1999**, 52 (2) 84-93.
- (13) El término *azonia* fue usado por primera vez en 1965 por Bradsher: Bradsher, C. K.; Kimber, R. W. L. *J. Org. Chem.* **1965**, 30, 1846. Bradsher usó el término "*azonialog*" para los cationes heteroaromáticos resultantes de la sustitución de un carbono cabeza de puente por un nitrógeno. Aunque las sales aromáticas de azinio o azolio pueden ser formalmente consideradas como heterociclos aromáticos de tipo azonia, ambos términos son de uso general y están aceptados para referirse a las sales generadas por la cuaternización de azinas y azoles, respectivamente.
- (14) Sucunza, D.;Cuadro, A. M.;Alvarez-Builla, J.;Vaquero, J. J. Recent Advances in the Synthesis of Azonia Aromatic Heterocycles *J. Org. Chem* **2016**, 81 (21) 10126-10135.
- (15) Schmidt, A. (2003). Heterocyclic Mesomeric Betaines and Analogs in Natural Product Chemistry. Betainic Alkaloids and Nucleobases. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, Academic Press. **85**: 67-171.
- (16) Beljanski, M.;Crochet, S. The selective anticancer agents PB-100 and BG-8 are active against human melanoma cells, but do not affect non malignant fibroblasts *Journal of Oncology* **1996**, 8 (6).

-
- (17) Bousta, D.;Soulimani, R.;Jarmouni, I.;Belon, P.;Falla, J.;Froment, N.;Younos, C. Neurotropic, immunological and gastric effects of low doses of *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L. and Poumon histamine in stressed mice *J. Ethnopharmacol.* **2001**, 74 (3) 205-215.
- (18) Costa-Campos, L.;Dassoler, S. C.;Rigo, A. P.;Iwu, M.;Elisabetsky, E. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2004**, 77 (3) 481-489.
- (19) Leitao da-Cunha, E. V.;Fechine, I. M.;Guedes, D. N.;Barbosa-Filho, J. M.;Sobral da Silva, M. (2005). Protoberberine Alkaloids. The Alkaloids: Chemistry and Biology. G. A. Cordell, Academic Press. **62**: 1-75.
- (20) Maiti, M.;Kumar, G. S. (2007). Protoberberine Alkaloids: Physicochemical and Nucleic Acid Binding Properties. Bioactive Heterocycles IV. M. T. H. Khan. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 155-209.
- (21) Grycová, L.;Dostál, J.;Marek, R. Quaternary protoberberine alkaloids *Phytochemistry* **2007**, 68 (2) 150-175.
- (22) Schneider, W.;Schroeter, K. Aceto-papaverin und Coralyn (Hexadehydro-coralyn) *Ber.* **1920**, 53 (8) 1459-1469.
- (23) Franceschin, M.;Rossetti, L.;D'Ambrosio, A.;Schirripa, S.;Bianco, A.;Ortaggi, G.;Savino, M.;Schultes, C.;Neidle, S. Natural and synthetic G-quadruplex interactive berberine derivatives *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16 (6) 1707-1711.
- (24) Bhadra, K.;Kumar, G. S. Therapeutic potential of nucleic acid-binding isoquinoline alkaloids: Binding aspects and implications for drug design *Med. Res. Rev.* **2011**, 31 (6) 821-862.
- (25) Martin, M. A.;del Castillo, B.;Lerner, D. A. Study of the luminescence properties of a new series of quinolizinium salts and their interaction with DNA *Anal. Chim. Acta.* **1988**, 205 (Supplement C) 105-115.
- (26) Jäger, K.;Bats, J. W.;Ihmels, H.;Granzhan, A.;Uebach, S.;Patrick, B. O. Polycyclic Azoniahetarenes: Assessing the Binding Parameters of Complexes between Unsubstituted Ligands and G-Quadruplex DNA *Chem. Eur. J.* **2012**, 18 (35) 10903-10915.
- (27) Strekowski, L. (2008). Heterocyclic Polymethine Dyes: Synthesis, Properties and Applications, Springer Berlin Heidelberg.
- (28) Ihmels, H.;Engels, B.;Faulhaber, K.;Lennartz, C. New Dyes Based on Amino-Substituted Acridizinium Salts-Synthesis and Exceptional Photochemical Properties *Chem. Eur. J.* **2000**, 6 (15) 2854-2864.
- (29) Ueno, T.;Nagano, T. Fluorescent probes for sensing and imaging *Nature Methods* **2011**, 8 642.
- (30) Martin, M. A.;del Castillo, B.;Prados, P. 13-Hydroxyacenaphato[1,2-*b*]quinolizinium bromide as a new fluorescence indicator *Talanta* **1993**, 40 (11) 1719-1723.
- (31) Arai, S.;Arai, H.;Hida, M. Synthesis and solvatochromic behavior of stilbazolium merocyanine-type dyes having a benzo[*c*]quinolizinium ring *Heterocycles* **1994**, 38 (11) 2449-2454.

-
- (32) Kobayashi, H.;Ogawa, M.;Alford, R.;Choyke, P. L.;Urano, Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5) 2620-2640.
- (33) Barbařina, A.;Amelia, M.;Latterini, L.;Aloisi, G. G.;Elisei, F. Photophysical Properties of Quinolizinium Salts and Their Interactions with DNA in Aqueous Solution *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113* (52) 14514-14520.
- (34) Granzhan, A.;Ihmels, H. N-Aryl-9-amino-Substituted Acridizinium Derivatives as Fluorescent "Light-Up" Probes for DNA and Protein Detection *Org. Lett.* **2005**, *7* (23) 5119-5122.
- (35) Faulhaber, K.;Granzhan, A.;Ihmels, H.;Otto, D.;Thomas, L.;Wells, S. Studies of the fluorescence light-up effect of amino-substituted benzo[b]quinolizinium derivatives in the presence of biomacromolecules *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10* (10) 1535-1545.
- (36) Westphal, O.;Jahn, K.;Heffe, W. Eine neue Synthese des Chinolizin-Ringsystems. Dehydrochinoliziniumsalze *Arch. Pharm.* **1961**, *294* 37.
- (37) Pastor, J.;Matia, M. P.;Navío, J. L. G.;Vaquero, J. J.;Alvarez-Builla, J. New Applications of Westphal Condensation. Synthesis of New [2.3.3]Cyclazinones *Heterocycles* **1989**, *29* (12).
- (38) Matia, M. P.;Navío, J. L. G.;Vaquero, J. J.;Alvarez-Builla, J. 2-Methylpyridinium salts as 1,4-dinucleophiles. IV. Westphal condensation with 2-alkyl-1-aminoazinium substrates *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27* (3) 661-665.
- (39) Molina, A.;Cuadro, A. M.;Alvarez-Builla, J.;Vaquero, J. J.;Navio, J. L. G. N-[2(1H)-Perimidinylmethyl]azinium Salts. Their Synthesis and Reaction with Electrophiles. *Heterocycles* **1990**, *31* 1451-1458.
- (40) Matia, M. P.;Ezquerro, J.;García-Navío, J. L.;Vaquero, J. J.;Alvarez-Builla, J. New uses of Westphal condensation: Synthesis of flavocorylene and related indolo[2,3-*a*]quinolizinium salts *tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (51) 7575-7578.
- (41) Matia, M. P.;Ezquerro, J.;Sánchez-Ferrando, F.;García-Navío, J. L.;Vaquero, J. J.;Alvarez-Builla, J. New uses of the westphal condensation. Synthesis of pi-donor-pi-acceptor heterocycles *Tetrahedron* **1991**, *47* (35) 7329-7342.
- (42) Matia, M. P.;García-Navío, J. L.;Vaquero, J. J.;Alvarez-Builla, J. Westphal Condensation of N-Aminocycloiminium Salts Synthesis of Fused Pyridazinium Derivatives *Liebigs. Ann. Chem.* **1992**, *1992* (7) 777-779.
- (43) Díaz, A.;Matia, M. P.;Garcia-Navio, J. L.;Vaquero, J. J.;Alvarez-Builla, J. Regioselectivity in the Westphal Condensation *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (26) 8294-8296.
- (44) Pastor, J.;Siró, J.;García-Navío, J.;Vaquero, J. J.;Melia Rodrigo, M.;Ballesteros, M.;Alvarez-Builla, J. Synthesis of new azino fused benzimidazolium salts. a new family of DNA intercalating agents. I *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5* (24) 3043-3048.
- (45) Martínez-Barrasa, V.;Burgos, C.;Izquierdo, M. L.;Alvarez-Builla, J.;Vaquero, J. J. The first example of an intramolecular Westphal reaction. Synthesis of a new aza-quinolizinium type system *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (21) 4115-4118.
- (46) Siró, J.;Ramos, A.;Vaquero, J. J.;Alvarez-Builla, J.;García-Navío, J. L. Optimized Synthesis of Di, Tri and Tetrafused Pyridazinium Cations *Tetrahedron* **2000**, *56* (16) 2469-2472.

-
- (47) Vaquero, J. J.; Alvarez-Builla, J. (2000). Cycloimmonium Salts and Their Ylides and Related Compounds: More Than Just 1,3-Dipoles. *Advances in Nitrogen Heterocycles*. U.K., JAI Press LTD: 159-245.
- (48) Delgado, F.; Linares, M. L.; Alajarín, R.; Vaquero, J. J.; Alvarez-Builla, J. Westphal Reaction in Solid-Phase *Org. Lett.* **2003**, 5 (22) 4057-4060.
- (49) Martínez, V.; Burgos, C.; Alvarez-Builla, J.; Fernández, G.; Domingo, A.; García-Nieto, R.; Gago, F.; Manzanares, I.; Cuevas, C.; Vaquero, J. J. Benzo[*f*]azino[2,1-*a*]phthalazinium Cations: Novel DNA Intercalating Chromophores with Antiproliferative Activity *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (5) 1136-1148.
- (50) Vaquero, J. J.; Alvarez-Builla, J. (2011). Heterocycles Containing a Ring-Junction Nitrogen. *Modern Heterocyclic Chemistry*. J. Alvarez-Builla and J. Barluenga, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 1989-2070.
- (51) García-Cuadrado, D.; Cuadro, A. M.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. Stille Reaction on Pyridinium Cations *Synlett* **2002**, 2002 (11) 1904-1906.
- (52) García, D.; Cuadro, A. M.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. Sonogashira Reaction on Quinolizinium Cations *Org. Lett.* **2004**, 6 (23) 4175-4178.
- (53) García-Cuadrado, D.; Cuadro, A. M.; Alvarez-Builla, J.; Sancho, U.; Castaño, O.; Vaquero, J. J. First Synthesis of Biquinolizinium Salts: Novel Example of a Chiral Azonia Dication *Org. Lett.* **2006**, 8 (26) 5955-5958.
- (54) García-Cuadrado, D.; Cuadro, A. M.; Barchín, B. M.; Nuñez, A.; Cañeque, T.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. Palladium-Mediated Functionalization of Heteroaromatic Cations: Comparative Study on Quinolizinium Cations *J. Org. Chem.* **2006**, 71 (21) 7989-7995.
- (55) Cañeque, T.; Cuadro, A. M.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. Efficient functionalization of quinolizinium cations with organotrifluoroborates in water *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50 (13) 1419-1422.
- (56) Tatiana, C.; M., C. A.; Julio, A.-B.; Javier, P.-M.; Koen, C.; Gema, M.; Francisco, M.; Obis, C.; L., A. J.; J., V. J. Heteroaromatic Cation-Based Chromophores: Synthesis and Nonlinear Optical Properties of Alkynylazinium Salts *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010 (33) 6323-6330.
- (57) Núñez, A.; Cuadro, A. M.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. A Unified Approach to Quinolizinium Cations and Related Systems by Ring-Closing Metathesis *Org. Lett.* **2004**, 6 (22) 4125-4127.
- (58) Nunez, A.; Cuadro, A. M.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. Enyne ring-closing metathesis on heteroaromatic cations *Chem. Comm.* **2006**, (25) 2690-2692.
- (59) Núñez, A.; Cuadro, A. M.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. A New Approach to Polycyclic Azonia Cations by Ring-Closing Metathesis *Org. Lett.* **2007**, 9 (16) 2977-2980.
- (60) Nuñez, A.; Abarca, B.; Cuadro, A. M.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. Ring-Closing Metathesis Reactions on Azinium Salts: Straightforward Access to Quinolizinium Cations and Their Dihydro Derivatives *J. Org. Chem* **2009**, 74 (11) 4166-4176.

-
- (61) Nuñez, A.;Abarca, B.;Cuadro, A. M.;Alvarez-Builla, J.;Vaquero, J. J. Ring-Closing Metathesis Approach to Heteroaromatic Cations: Synthesis of Benzo[a]quinolizinium Salts *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011 (7) 1280-1290.
- (62) Abarca, B.;Custodio, R.;Cuadro, A. M.;Sucunza, D.;Domingo, A.;Mendicuti, F.;Alvarez-Builla, J.;Vaquero, J. J. Efficient Synthesis of an Indoloquinolizinium Alkaloid Selective DNA-Binder by Ring-Closing Metathesis *Org. Lett.* **2014**, 16 (13) 3464-3467.
- (63) Abengózar, A.;Abarca, B.;Cuadro, A. M.;Sucunza, D.;Álvarez-Builla, J.;Vaquero, J. J. Azonia Aromatic Cations by Ring-Closing Metathesis: Synthesis of Azaquinolizinium Cations *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2015 (19) 4214-4223.
- (64) García-Henandez, V. (2009). Desarrollo y validación de nuevas metodologías para la caracterización de la interacción con ADN. Estudio de la unión de cromóforos catiónicos heteroaromáticos con potencialidad intercalante. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Universidad de Alcalá
- (65) Maçôas, E.;Marcelo, G.;Pinto, S.;Cañeque, T.;Cuadro, A. M.;Vaquero, J. J.;Martinho, J. M. G. A V-shaped cationic dye for nonlinear optical bioimaging *Chem. Comm.* **2011**, 47 (26) 7374-7376.
- (66) Cañeque, T.;Cuadro, A. M.;Alvarez-Builla, J.;Pérez-Moreno, J.;Clays, K.;Castaño, O.;Andrés, J. L.;Vaquero, J. J. Novel charged NLO chromophores based on quinolizinium acceptor units *Dyes Pigm.* **2014**, 101 116-121.
- (67) Cañeque, T.;Cuadro, A. M.;Custodio, R.;Alvarez-Builla, J.;Batanero, B.;Gómez-Sal, P.;Pérez-Moreno, J.;Clays, K.;Castaño, O.;Andrés, J. L.;Carmona, T.;Mendicuti, F.;Vaquero, J. J. Azonia aromatic heterocycles as a new acceptor unit in D- π -A+vs D-A+ nonlinear optical chromophores *Dyes Pigm.* **2017**, 144 17-31.
- (68) Marcelo, G.;Pinto, S.;Cañeque, T.;Mariz, I. F. A.;Cuadro, A. M.;Vaquero, J. J.;Martinho, J. M. G.;Maçôas, E. M. S. Nonlinear Emission of Quinolizinium-Based Dyes with Application in Fluorescence Lifetime Imaging *J. Phys. Chem. A* **2015**, 119 (11) 2351-2362.
- (69) Siro, J. G. (1998). Aplicación de la condensación de Westphal para la síntesis de nuevos agentes intercalantes de ADN. Química Orgánica, Universidad de Alcalá.
- (70) Westphal, O.;Feix, G.;Joos, A. Aromatic and Heterocyclic 3,4-Disubstituted Pyridines *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1969**, 8 (1) 74-75.
- (71) Xie, Y.;Tam, V. K.;Tor, Y. (2010). The Interactions of Small Molecules with DNA and RNA. The Chemical Biology of Nucleic Acids. G. Mayer, Wiley: 115-138.
- (72) Luque, J.;Herráez, Á. (2006). Componentes fundamentales de los acidos nucleicos Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética Elsevier: 9-17.
- (73) Watson, J. D.;Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid *Nature* **1953**, 171 737.
- (74) Dickerson, R.;Drew, H.;Conner, B.;Wing, R.;Fratini, A.;Kopka, M. The anatomy of A-, B-, and Z-DNA *Science* **1982**, 216 (4545) 475-485.
- (75) Hannon, M. J. Supramolecular DNA recognition *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36 (2) 280-295.
- (76) Saenger, W. (1984). Principles of Nucleic Acid Structure Springer-Verlag New York.

-
- (77) Perahia, D.;Pullman, A.;Pullman, B. The molecular electrostatic potential of the B-DNA helix *Theor. Chim. Acta.* **1979**, *51* (4) 349-357.
- (78) Neidle, S. (2002). *Nucleic Acid Structure and Recognition*, Oxford University Press.
- (79) Alden, C. J.;Kim, S.-H. Solvent-accessible surfaces of nucleic acids *J. Mol. Biol.* **1979**, *132* (3) 411-434.
- (80) Record, M. T.;Anderson, C. F.;Lohman, T. M. Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity *Q. Rev. Biophys.* **1978**, *11* (2) 103-178.
- (81) Manning, G. S. Counterion binding in polyelectrolyte theory *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12* (12) 443-449.
- (82) Chaires, J. B. Energetics of drug-DNA interactions *Biopolymers* **1997**, *44* (3) 201-215.
- (83) Bauer, G. B.;Povirk, L. F. Specificity and kinetics of interstrand and intrastrand bifunctional alkylation by nitrogen mustards at a G-G-C sequence *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (6) 1211-1218.
- (84) Reedijk, J. New clues for platinum antitumor chemistry: Kinetically controlled metal binding to DNA *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100* (7) 3611-3616.
- (85) Girouard, M.;Diallo, K.;Marchand, B.;McCormick, S.;Götte, M. Mutations E44D and V118I in the reverse transcriptase of HIV-1 play distinct mechanistic roles in dual resistance to AZT and 3TC *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (36) 34403-34410.
- (86) Marchand, B.;White, K. L.;Ly, J. K.;Margot, N. A.;Wang, R.;McDermott, M.;Miller, M. D.;Götte, M. Effects of the Translocation Status of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase on the Efficiency of Excision of Tenofovir *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2007**, *51* (8) 2911-2919.
- (87) Matthias, G. Effects of Nucleotides and Nucleotide Analogue Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase in a Ratchet Model of Polymerase Translocation *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12* (15) 1867-1877.
- (88) Schreiber, I. R.;Schiff, E. R. Prevention and treatment of recurrent Hepatitis B after liver transplantation: the current role of nucleoside and nucleotide analogues *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2006**, *5* 8-8.
- (89) Bailly, C.;Chaires, J. B. Sequence-Specific DNA Minor Groove Binders. Design and Synthesis of Netropsin and Distamycin Analogues *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9* (5) 513-538.
- (90) Bhattacharya, S.;Thomas, M. Facile synthesis of oligopeptide distamycin analogs devoid of hydrogen bond donors or acceptors at the N-terminus: sequence-specific duplex DNA binding as a function of peptide chain length *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (29) 5571-5575.
- (91) Eriksson, S.;Kim, S. K.;Kubista, M.;Norden, B. Binding of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to AT regions of DNA: Evidence for an allosteric conformational change *Biochemistry* **1993**, *32* (12) 2987-2998.
- (92) Brown, D. G.;Sanderson, M. R.;Garman, E.;Neidle, S. Crystal structure of a berenil-d(CGCAAATTTGCG) complex: An example of drug-DNA recognition based on sequence-dependent structural features *J. Mol. Biol.* **1992**, *226* (2) 481-490.

-
- (93) Holmquist, G. Hoechst 33258 fluorescent staining of *Drosophila* chromosomes *Chromosoma* **1975**, 49 (4) 333-356.
- (94) Bourdouxhe, C.;Colson, P.;Houssier, C.;Hénichart, J. P.;Waring, M. J.;Denny, W. A.;Bailly, C. Design of composite drug molecules: mutual effects on binding to DNA of an intercalator, amsacrine, and a minor groove binder, netropsin. *Anti-cancer drug design* **1995**, 10 2.
- (95) David-Cordonnier, M.-H.;Hildebrand, M.-P.;Baldeyrou, B.;Lansiaux, A.;Keuser, C.;Benzschawel, K.;Lemster, T.;Pindur, U. Design, synthesis and biological evaluation of new oligopyrrole carboxamides linked with tricyclic DNA-intercalators as potential DNA ligands or topoisomerase inhibitors *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42 (6) 752-771.
- (96) Gago, F. Stacking Interactions and Intercalative DNA Binding *Methods* **1998**, 14 (3) 277-292.
- (97) Ren, J.;Jenkins, T. C.;Chaires, J. B. Energetics of DNA Intercalation Reactions *Biochemistry* **2000**, 39 (29) 8439-8447.
- (98) Sartorius, J.;Schneider, H.-J. Intercalation mechanisms with ds-DNA: binding modes and energy contributions with benzene, naphthalene, quinoline and indole derivatives including some antimalarials [dagger] *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2* **1997**, (11) 2319-2328.
- (99) Ihmels, H.;Otto, D. (2005). Intercalation of Organic Dye Molecules into Double-Stranded DNA -- General Principles and Recent Developments. *Supermolecular Dye Chemistry*. F. Würthner. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 161-204.
- (100) Herzyk, P.;Neidle, S.;Goodfellow, J. M. Conformation and Dynamics of Drug-DNA Intercalation *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1992**, 10 (1) 97-139.
- (101) Friedman, R. A. G.;Manning, G. S. Polyelectrolyte effects on site-binding equilibria with application to the intercalation of drugs into DNA *Biopolymers* **1984**, 23 (12) 2671-2714.
- (102) Rao, S. N.;Kollman, P. A. Molecular mechanical simulations on double intercalation of 9-amino acridine into d(CGCGCGC) X d(GCGCGCG): analysis of the physical basis for the neighbor-exclusion principle *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84 (16) 5735-5739.
- (103) A Y Chen, a.;Liu, L. F. DNA Topoisomerases: Essential Enzymes and Lethal Targets *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1994**, 34 (1) 191-218.
- (104) Wang, J. C. DNA Topoisomerases *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65 (1) 635-692.
- (105) Li, T.-K.;Liu, L. F. Tumor Cell Death Induced by Topoisomerase-Targeting Drugs *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, 41 (1) 53-77.
- (106) Lepecq, J. B.;Paoletti, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: Physical—Chemical characterization *J. Mol.Biol.* **1967**, 27 (1) 87-106.
- (107) Denny, W. A. (2004). Acridine-4-Carboxamides and the Concept of Minimal DNA Intercalators. *Small Molecule DNA and RNA Binders*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 482-502.
- (108) Hippel, P. H. v.;McGhee, J. D. DNA-Protein Interactions *Annu. Rev. Biochem.* **1972**, 41 (1) 231-300.
- (109) Dervan, P. Design of sequence-specific DNA-binding molecules *Science* **1986**, 232 (4749) 464-471.

- (110) Dervan, P. B. Molecular recognition of DNA by small molecules *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9 (9) 2215-2235.
- (111) Wirth, M.;Buchardt, O.;Koch, T.;Nielsen, P. E.;Norden, B. Interactions between DNA and mono-, bis-, tris-, tetrakis-, and hexakis(aminoacridines). A linear and circular dichroism, electric orientation relaxation, viscometry, and equilibrium study *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110 (3) 932-939.
- (112) Adrienne, A. Crystal Structures of Acridines Complexed with Nucleic Acids *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9 (18) 1667-1675.
- (113) Antonini, I. DNA-binding Antitumor Agents: from Pyrimido[5,6,1-*de*]acridines to Other Intriguing Classes of Acridine Derivatives *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9 (18) 1701-1716.
- (114) Tsann-Long, S. Development of DNA Topoisomerase II-Mediated Anticancer Agents, 3-(9-Acridinylamino)-5-hydroxymethylanilines (AHMAs) and Related Compounds *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9 (18) 1677-1688.
- (115) Gamage, S. A.;Tepsiri, N.;Wilairat, P.;Wojcik, S. J.;Figgitt, D. P.;Ralph, R. K.;Denny, W. A. Synthesis and in vitro Evaluation of 9-Anilino-3,6-diaminoacridines Active Against a Multidrug-Resistant Strain of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* *J. Med. Chem.* **1994**, 37 (10) 1486-1494.
- (116) Gamage, S. A.;Figgitt, D. P.;Wojcik, S. J.;Ralph, R. K.;Ransijn, A.;Mauel, J.;Yardley, V.;Snowdon, D.;Croft, S. L.;Denny, W. A. Structure-Activity Relationships for the Antileishmanial and Antitrypanosomal Activities of 1'-Substituted 9-Anilinoacridines *J. Med. Chem.* **1997**, 40 (16) 2634-2642.
- (117) Charmantray, F.;Demeunynck, M.;Carrez, D.;Croisy, A.;Lansiaux, A.;Bailly, C.;Colson, P. 4-Hydroxymethyl-3-aminoacridine Derivatives as a New Family of Anticancer Agents *J. Med. Chem.* **2003**, 46 (6) 967-977.
- (118) Hicks, K. O.;Ohms, S. J.;van Zijl, P. L.;Denny, W. A.;Hunter, P. J.;Wilson, W. R. An experimental and mathematical model for the extravascular transport of a DNA intercalator in tumours *Br. J. Cancer* **1997**, 76 (7) 894-903.
- (119) Cheng, C. C.;Zee-Cheng, R. K. Y. (1983). 2 The Design, Synthesis and Development of a New Class of Potent Antineoplastic Anthraquinones. Progress in Medicinal Chemistry. G. P. Ellis and G. B. West, Elsevier. **20**: 83-118.
- (120) Krohn, K. Anthracycline and Anthracenedione-Based Anticancer Agents. Edited by J. W. Lown. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1988. 738 S. geb. HF1. 440.00. – ISBN 0-444-87275-2 *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 102 (2) 231-232.
- (121) Gandolfi, C. A.;Beggiolin, G.;Menta, E.;Palumbo, M.;Sissi, C.;Spinelli, S.;Johnson, F. Chromophore-Modified Antitumor Anthracenediones: Synthesis, DNA Binding, and Cytotoxic Activity of 1,4-Bis[(aminoalkyl)amino]benzo[*g*]phthalazine-5,10-diones *J. Med. Chem.* **1995**, 38 (3) 526-536.
- (122) Kapuscinski, J.;Darzynkiewicz, Z.;Traganos, F.;Melamed, M. R. Interactions of a new antitumor agent, 1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]-ethyl]amino]-9,10-anthracenedione, with nucleic acids *Biochem. Pharmacol.* **1981**, 30 (3) 231-240.

-
- (123) Foye, W. O.;Vajragupta, O.;Sengupta, S. K. DNA-Binding Specificity and RNA Polymerase Inhibitory Activity of Bis(aminoalkyl)anthraquinones and Bis(methylthio)vinylquinolinium Iodides *J. Pharm. Sci.* **1982**, *71* (2) 253-257.
- (124) Koyama, M.;Kelly, T. R.;Watanabe, K. A. Novel type of potential anticancer agents derived from chrysophanol and emodin. Some structure-activity relationship studies *J. Med. Chem.* **1988**, *31* (2) 283-284.
- (125) Gourdie, T. A.;Prakash, A. S.;Wakelin, L. P. G.;Woodgate, P. D.;Denny, W. A. Synthesis and evaluation of DNA-targeted spatially separated bis(aniline mustards) as potential alkylating agents with enhanced DNA cross-linking capability *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (1) 240-248.
- (126) Kohler, B.;Su, T. L.;Chou, T. C.;Jiang, X. J.;Watanabe, K. A. Synthesis of cyclopentantraquinones: analogs of mitomycin C *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (7) 1680-1686.
- (127) Carter, S. K.;Crooke, S. T.;Alder, N. A. (1979). Mitomycin C: current status and new developments, Academic Press.
- (128) Mishra, A.;Behera, R. K.;Behera, P. K.;Mishra, B. K.;Behera, G. B. Cyanines during the 1990s: A Review *Chem. Rev.* **2000**, *100* (6) 1973-2012.
- (129) Rye, H. S.;Yue, S.;Wemmer, D. E.;Quesada, M. A.;Haugland, R. P.;Mathies, R. A.;Glazer, A. N. Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications *Nucleic Acid Res.* **1992**, *20* (11) 2803-2812.
- (130) Carlsson, C.;Larsson, A.;Jonsson, M.;Albinsson, B.;Norden, B. Optical and Photophysical Properties of the Oxazole Yellow DNA Probes YO and YOYO *J. Phys. Chem.* **1994**, *98* (40) 10313-10321.
- (131) Gurrieri, S.;Wells, K. S.;Johnson, I. D.;Bustamante, C. Direct Visualization of Individual DNA Molecules by Fluorescence Microscopy: Characterization of the Factors Affecting Signal/Background and Optimization of Imaging Conditions Using YOYO *Anal. Biochem.* **1997**, *249* (1) 44-53.
- (132) Larsson, A.;Carlsson, C.;Jonsson, M.;Albinsson, B. Characterization of the Binding of the Fluorescent Dyes YO and YOYO to DNA by Polarized Light Spectroscopy *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (19) 8459-8465.
- (133) Larsson, A.;Carlsson, C.;Jonsson, M. Characterization of the binding of YO to [poly(dA-dT)]₂ and [poly(dG-dC)]₂, and of the fluorescent properties of YO and YOYO complexed with the polynucleotides and double-stranded DNA *Biopolymers* **1995**, *36* (2) 153-167.
- (134) Spielmann, H. P.;Wemmer, D. E.;Jacobsen, J. P. Solution Structure of a DNA Complex with the Fluorescent Bis-Intercalator TOTO Determined by NMR Spectroscopy *Biochemistry* **1995**, *34* (27) 8542-8553.
- (135) Waring, M. J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids *J. Mol. Biol.* **1965**, *13* (1) 269-282.
- (136) Crothers, D. M. Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers *Biopolymers* **1968**, *6* (4) 575-584.

-
- (137) Nordmeier, E. Absorption spectroscopy and dynamic and static light-scattering studies of ethidium bromide binding to calf thymus DNA: implications for outside-binding and intercalation *J. Phys. Chem.* **1992**, *96* (14) 6045-6055.
- (138) Byrne, C. D.;de Mello, A. J. Photophysics of ethidium bromide complexed to ct-DNA: a maximum entropy study *Biophys. Chem.* **1998**, *70* (3) 173-184.
- (139) Monaco, R. R.;Hausheer, F. H. Binding Site for Ethidium Cation in the Major Groove of B-Form DNA *J. Biomol. Struct.* **1993**, *10* (4) 675-680.
- (140) Porumb, H. The solution spectroscopy of drugs and the drug-nucleic acid interactions *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1979**, *34* (Supplement C) 175-195.
- (141) Olmsted, J.;Kearns, D. R. Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids *Biochemistry* **1977**, *16* (16) 3647-3654.
- (142) Hudson, B.;Jacobs, R. The ultraviolet transitions of the ethidium cation *Biopolymers* **1975**, *14* (6) 1309-1312.
- (143) Heller, D. P.;Greenstock, C. L. Fluorescence lifetime analysis of DNA intercalated ethidium bromide and quenching by free dye *Biophys. Chem.* **1994**, *50* (3) 305-312.
- (144) Zee-Cheng, K. Y.;Cheng, C. C. Interaction between dna and coralyne acetosulfate, an antileukemic compound *J. Pharm. Sci.* **1973**, *62* (9) 1572-1573.
- (145) Phillips, S. D.;Castle, R. N. A review of the chemistry of the antitumor benzo[c]phenanthridine alkaloids nitidine and fagaronine and of the related antitumor alkaloid coralyne *J. Heterocyclic Chem.* **1981**, *18* (2) 223-232.
- (146) Gupta, R. S.;Murray, W.;Gupta, R. Cross resistance pattern towards anticancer drugs of a human carcinoma multidrug-resistant cell line *Br. J. Cancer* **1988**, *58* 441.
- (147) Gatto, B.;Sanders, M. M.;Yu, C.;Wu, H.-Y.;Makhey, D.;LaVoie, E. J.;Liu, L. F. Identification of Topoisomerase I as the Cytotoxic Target of the Protoberberine Alkaloid Coralyne *Cancer Res.* **1996**, *56* (12) 2795-2800.
- (148) Wilson, W. D.;Gough, A. N.;Doyle, J. J.;Davidson, M. W. Coralyne. Intercalation with DNA as a possible mechanism of antileukemic action *J. Med. Chem.* **1976**, *19* (10) 1261-1263.
- (149) Gough, A. N.;Jones, R. L.;Wilson, W. D. Dimerization of coralyne and its propyl analog and their association with DNA *J. Med. Chem.* **1979**, *22* (12) 1551-1554.
- (150) Albergo, D. D.;Turner, D. H. Solvent effects on the thermodynamics of double-helix formation in (dG-dC)₃ *Biochemistry* **1981**, *20* (6) 1413-1418.
- (151) Caprasse, M.;Houssier, C. Physico-chemical investigation of the mode of binding of the alkaloids 5,6-dihydroflavopereirine and sempervirine with DNA *Biochimie* **1984**, *66* (1) 31-41.
- (152) Granzhan, A.;Ihmels, H. Playing Around with the Size and Shape of Quinolizinium Derivatives: Versatile Ligands for Duplex, Triplex, Quadruplex and Abasic Site-Containing DNA *Synlett* **2016**, *27* (12) 1775-1793.
- (153) Molina, A.;Vaquero, J. J.;García-Navio, J.;Alvarez-Builla, J.;Rodrigo, M. M.;Castaño, O.;de Andres, J. Azonia derivatives of the γ -carboline system. A new class of DNA intercalators *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6* (13) 1453-1456.

- (154) Molina, A.;Vaquero, J. J.;Garcia-Navio, J. L.;Alvarez-Builla, J.;de Pascual-Teresa, B.;Gago, F.;Rodrigo, M. M. Novel DNA Intercalators Based on the Pyridazino[1',6':1,2]pyrido[4,3-b]indol-5-inium System *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (11) 3907-3915.
- (155) Martín, M. A.;Bouin, A. S.;Muñoz-Botella, S.;del Castillo, B. A Study of the Interaction of Polycyclic Derivatives of Azaquinolizinium Salts with DNA *Polycyclic Aromatic Compounds* **2002**, *22* (1) 37-53.
- (156) Fernández, G. (2001). Estudio de la interacción con ADN de compuestos potencialmente antitumorales, Universidad de Alcalá.
- (157) Bohne, C.;Faulhaber, K.;Giese, B.;Häfner, A.;Hofmann, A.;Ihmels, H.;Köhler, A.-K.;Perä, S.;Schneider, F.;Sheepwash, M. A. L. Studies on the Mechanism of the Photo-Induced DNA Damage in the Presence of Acridizinium SaltsInvolvement of Singlet Oxygen and an Unusual Source for Hydroxyl Radicals *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (1) 76-85.
- (158) Granzhan, A.;Ihmels, H.;Viola, G. 9-Donor-Substituted Acridizinium Salts: Versatile Environment-Sensitive Fluorophores for the Detection of Biomacromolecules *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (5) 1254-1267.
- (159) Bortolozzi, R.;Ihmels, H.;Thomas, L.;Tian, M.;Viola, G. 9-(4-Dimethylaminophenyl)benzo[*b*]quinolizinium: A Near-Infrared Fluorophore for the Multicolor Analysis of Proteins and Nucleic Acids in Living Cells *Chem.-Eur. J.* **2013**, *19* (27) 8736-8741.
- (160) Granzhan, A.;Ihmels, H.;Tian, M. The benzo[*b*]quinolizinium ion as a water-soluble platform for the fluorimetric detection of biologically relevant analytes *Arkivoc* **2015**, *2015* (vi).
- (161) Ihmels, H.;Faulhaber, K.;Wissel, K.;Viola, G.;Vedaldi, D. 6-Aminoacridizinium bromide: a fluorescence probe which lights up in AT-rich regions of DNA *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (17) 2999-3001.
- (162) Valeur, B.;Berberan-Santos, M. N. A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory *J. Chem. Educ.* **2011**, *88* (6) 731-738.
- (163) Eftink, M. R. (2000). Intrinsic Fluorescence of Proteins. Topics in Fluorescence Spectroscopy: Volume 6: Protein Fluorescence. J. R. Lakowicz. Boston, MA, Springer US: 1-15.
- (164) Lakowicz, J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Boston, MA, Springer US.
- (165) Turro, N. J.;Ramamurthy, V.;Saciano, J. C. (2009). Principles of Molecular Photochemistry: An introduction, University Science Books.
- (166) De Paula, A.;De Paula, J. (2008). Espectroscopia Molecular 2: Transiciones electrónicas. Química Física 8, Medica Panamericana
- (167) Jabłoński, A. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren *Zeitschrift für Physik* **1935**, *94* (1) 38-46.
- (168) Guillet, J. (1985). Polymer Photophysics Photochemistry: An Introduction to the Study of Photoprocesses in Macromolecules, Cambridge University Press.
- (169) Carmona Perez, T. (2014). Estudio termodinámico de los procesos implicados en la complejación de ciclodextrinas modificadas y cucurbituriles con moléculas sensibles al entorno molecular Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química. Alcalá de Henares Universidad de Alcalá.

-
- (170) Steiner, R. F. (2002). Fluorescence Anisotropy: Theory and Applications. Topics in Fluorescence Spectroscopy: Principles. J. R. Lakowicz. Boston, MA, Springer US: 1-52.
- (171) Valeur, B.;Berberan-Santos, M. N. (2002). Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- (172) Rabeck, J. F. (1987). Mechanisms of Photophysical Processes and Photochemical Reactions in Polymers: Theory and Applications. Chichester John Wiley & Sons
- (173) Molina, A.;Vaquero, J. J.;García-Navio, J. L.;Alvarez-Builla, J.;de Pascual-Teresa, B.;Gago, F.;Rodrigo, M. M.;Ballesteros, M. Synthesis and DNA Binding Properties of γ -Carbolinium Derivatives and Benzologues *J. Org. Chem.* **1996**, 61 (16) 5587-5599.
- (174) Pastor, J.;Siro, J. G.;García-Navío, J. L.;Vaquero, J. J.;Alvarez-Builla, J.;Gago, F.;de Pascual-Teresa, B.;Pastor, M.;Rodrigo, M. M. Azino-Fused Benzimidazolium Salts as DNA Intercalating Agents. 2 *J. Org. Chem.* **1997**, 62 (16) 5476-5483.
- (175) Zhou, J.;Sayre, D. A.;Zheng, Y.;Szmazinski, H.;Sintim, H. O. Unexpected Complex Formation between Coralyne and Cyclic Diadenosine Monophosphate Providing a Simple Fluorescent Turn-on Assay to Detect This Bacterial Second Messenger *Anal. Chem.* **2014**, 86 (5) 2412-2420.
- (176) Berova, N.;Nakanishi, K.;Woody, R. (2000). Circular Dichroism: Principles and Applications, Wiley.
- (177) Levine, I. N. (2004). Espectroscopia y Fotoquímica. Fisicoquímica Madrid McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- (178) Urbanová, M.;Maloň, P. (2007). Circular Dichroism Spectroscopy. Analytical Methods in Supramolecular Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 265-304.
- (179) Bradsher, C. K.;Kimber, R. W. L. Synthesis of Benzo[*a*]- and Naphtho[2,1-*a*]phenanthridinium Salts*,1 *J. Org. Chem.* **1965**, 30 (6) 1846-1849.
- (180) Boekelheide, V.;Gall, W. G. A Synthesis of Quinolizinium and Dehydroquinolizinium Derivatives1 *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76 (7) 1832-1836.
- (181) Arai, S.;Hida, M. (1992). Polycyclic Aromatic Nitrogen Cations. Advances in Heterocyclic Chemistry. A. R. Katritzky, Academic Press. **55**: 261-358.
- (182) Wolff, M. E. Cyclization of N-Halogenated Amines (The Hofmann-Löffler Reaction) *Chem. Rev.* **1963**, 63 (1) 55-64.
- (183) Breslow, R.;Heyer, D. Catalytic multiple template-directed steroid chlorinations *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104 (7) 2045-2046.
- (184) Arndtsen, B. A.;Bergman, R. G.;Mobley, T. A.;Peterson, T. H. Selective Intermolecular Carbon-Hydrogen Bond Activation by Synthetic Metal Complexes in Homogeneous Solution *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28 (3) 154-162.
- (185) Davies, H. M. L.;Morton, D. Recent Advances in C–H Functionalization *J. Org. Chem.* **2016**, 81 (2) 343-350.
- (186) Crabtree, R. H.;Lei, A. Introduction: CH Activation *Chem. Rev.* **2017**, 117 (13) 8481-8482.
- (187) Roudesly, F.;Oble, J.;Poli, G. Metal-catalyzed CH activation/functionalization: The fundamentals *J. Mol. Catal. A: Chem* **2017**, 426 275-296.

- (188) Luo, C.-Z.;Gandeepan, P.;Cheng, C.-H. A convenient synthesis of quinolizinium salts through Rh(iii) or Ru(ii)-catalyzed C-H bond activation of 2-alkenylpyridines *Chem. Comm.* **2013**, 49 (76) 8528-8530.
- (189) Zhang, G.;Yang, L.;Wang, Y.;Xie, Y.;Huang, H. An Efficient Rh/O₂ Catalytic System for Oxidative C–H Activation/Annulation: Evidence for Rh(I) to Rh(III) Oxidation by Molecular Oxygen *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (24) 8850-8853.
- (190) Davies, D. L.;Ellul, C. E.;Macgregor, S. A.;McMullin, C. L.;Singh, K. Experimental and DFT Studies Explain Solvent Control of C–H Activation and Product Selectivity in the Rh(III)-Catalyzed Formation of Neutral and Cationic Heterocycles *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (30) 9659-9669.
- (191) Umeda, N.;Tsurugi, H.;Satoh, T.;Miura, M. Fluorescent Naphthyl- and Anthryl azoles from the Catalytic Coupling of Phenyl azoles with Internal Alkynes through the Cleavage of Multiple C–H Bonds *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47 (21) 4019-4022.
- (192) Umeda, N.;Hirano, K.;Satoh, T.;Shibata, N.;Sato, H.;Miura, M. Rhodium-Catalyzed Oxidative 1:1, 1:2, and 1:4 Coupling Reactions of Phenyl azoles with Internal Alkynes through the Regioselective Cleavages of Multiple C–H Bonds *J. Org. Chem.* **2011**, 76 (1) 13-24.
- (193) Prakash, S.;Muralirajan, K.;Cheng, C.-H. Cobalt-Catalyzed Oxidative Annulation of Nitrogen-Containing Arenes with Alkynes: An Atom-Economical Route to Heterocyclic Quaternary Ammonium Salts *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55 (5) 1844-1848.
- (194) Ghorai, D.;Choudhury, J. Exploring a unique reactivity of N-heterocyclic carbenes (NHC) in rhodium(iii)-catalyzed intermolecular C-H activation/annulation *Chem. Comm.* **2014**, 50 (96) 15159-15162.
- (195) Ge, Q.;Li, B.;Song, H.;Wang, B. Rhodium(iii)-catalyzed cascade oxidative annulation reactions of aryl imidazolium salts with alkynes involving multiple C-H bond activation *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13 (28) 7695-7710.
- (196) Li, R.;Hu, Y.;Liu, R.;Hu, R.;Li, B.;Wang, B. Ruthenium(II)-Catalyzed Oxidative Annulation Reactions of Arylimidazolium Salts via N-Heterocyclic Carbene-Directed C–H Activation *Adv. Synth. Catal.* **2015**, 357 (18) 3885-3892.
- (197) Ge, Q.;Hu, Y.;Li, B.;Wang, B. Synthesis of Conjugated Polycyclic Quinoliums by Rhodium(III)-Catalyzed Multiple C–H Activation and Annulation of Arylpyridiniums with Alkynes *Org. Lett.* **2016**, 18 (10) 2483-2486.
- (198) Luo, C.-Z.;Gandeepan, P.;Wu, Y.-C.;Tsai, C.-H.;Cheng, C.-H. Cooperative C(sp³)–H and C(sp²)–H Activation of 2-Ethylpyridines by Copper and Rhodium: A Route toward Quinolizinium Salts *ACS Catal.* **2015**, 5 (8) 4837-4841.
- (199) Nevado, C. La reacción de metatesis como herramienta fundamental en la síntesis total de productos naturales complejos *Anales de la Química* **2008**, 104 (1) 15-22.
- (200) Hoveyda, A. H.;Zhugralin, A. R. The remarkable metal-catalysed olefin metathesis reaction *Nature* **2007**, 450 243.
- (201) Connon, S. J.;Blechert, S. Recent Developments in Olefin Cross-Metathesis *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42 (17) 1900-1923.

-
- (202) Chatterjee, A. K.;Choi, T.-L.;Sanders, D. P.;Grubbs, R. H. A General Model for Selectivity in Olefin Cross Metathesis *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (37) 11360-11370.
- (203) Schrock, R. R. High Oxidation State Multiple Metal–Carbon Bonds *Chem. Rev.* **2002**, *102* (1) 145-180.
- (204) Schrock, R. R.;Hoveyda, A. H. Molybdenum and Tungsten Imido Alkylidene Complexes as Efficient Olefin-Metathesis Catalysts *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (38) 4592-4633.
- (205) Toreki, R.;Schrock, R. R. A well-defined rhenium(VII) olefin metathesis catalyst *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (6) 2448-2449.
- (206) Castarlenas, R.;Esteruelas, M. A.;Oñate, E. N-Heterocyclic Carbene–Osmium Complexes for Olefin Metathesis Reactions *Organometallics* **2005**, *24* (18) 4343-4346.
- (207) Schmidt, B. H., S.; Krehl, S.; Kunz, O. (2014). Ring-Closing Metathesis. *Comprehensive Organic Synthesis*. P. M. Knochel, G. A. Amsterdam, Elsevier. **5**: 1400-1480.
- (208) Fu, G. C.;Grubbs, R. H. The application of catalytic ring-closing olefin metathesis to the synthesis of unsaturated oxygen heterocycles *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (13) 5426-5427.
- (209) Fu, G. C.;Grubbs, R. H. The synthesis of nitrogen heterocycles via catalytic ring-closing metathesis of dienes *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (18) 7324-7325.
- (210) Villar, H.;Frings, M.;Bolm, C. Ring closing enyne metathesis: A powerful tool for the synthesis of heterocycles *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (1) 55-66.
- (211) Lippstreu, J. J.;Straub, B. F. Mechanism of Enyne Metathesis Catalyzed by Grubbs Ruthenium–Carbene Complexes: A DFT Study *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (20) 7444-7457.
- (212) Mori, M.;Sakakibara, N.;Kinoshita, A. Remarkable Effect of Ethylene Gas in the Intramolecular Enyne Metathesis of Terminal Alkynes *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (18) 6082-6083.
- (213) Kitamura, T.;Sato, Y.;Mori, M. Effects of Substituents on the Multiple Bonds on Ring-Closing Metathesis of Enynes *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344* (6-7) 678-693.
- (214) Glover, E. E.;Jones, G. 614. Quinolizines. Part II. A synthesis of alkyl- and of aryl-quinolizinium salts *J. Chem. Soc.* **1958**, (0) 3021-3028.
- (215) Kimber, R. W. L.;Parham, J. C. Aromatic Cyclodehydration. LV.1 Quaternizations with Chloroacetaldoxime *J. Org. Chem.* **1963**, *28* (11) 3205-3206.
- (216) Arai, S.;Takeuchi, T.;Ishikawa, M.;Takeuchi, T.;Yamazaki, M.;Hida, M. Syntheses of condensed polycyclic azonia aromatic compounds by photocyclization *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1987**, (0) 481-487.
- (217) Bradsher, C. K.;Beavers, L. E. Aromatic Cyclodehydration. XXIX.1 7-Methyl- and 7-Phenylbenzo[*a*]quinolizinium Salts *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (2) 453-455.
- (218) Bradsher, C. K.;Solomons, T. W. G.;Vaughan, F. R. Acridizinium Compounds by the Cyclization of Oximes *J. Org. Chem.* **1960**, *25* (5) 757-759.
- (219) Bradsher, C. K.;Parham, J. C. Aromatic Cyclodehydration. LII.1 Carbonyl Derivatives as Intermediates in the Acridizinium Synthesis *J. Org. Chem.* **1963**, *28* (1) 83-85.
- (220) Sliwa, W. The Reactivity of N-Substituted Pyridinium Salts *Heterocycles* **1986**, *24* 181-219.

-
- (221) Menschutkin, N. Beiträgen zur Kenntnis der Affinitätskoeffizienten der Alkylhaloide und der organischen Amine *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **1890**, 5 589.
- (222) Gösl, R.;Meuwsen, A. Synthese substituierter Hydrazine aus Aminen mit Hydroxylamin-O-sulfonsäure *Chem. Ber.* **1959**, 92 (10) 2521-2531.
- (223) Tamura, Y.;Minamikawa, J.;Ikeda, M. O-Mesitylenesulfonylhydroxylamine and Related Compounds - Powerful Aminating Reagents *Synthesis* **1977**, 1977 (01) 1-17.
- (224) Laus, G.;Klötzer, W. Synthesis of 1-Amino-1H-1,2,4-triazoles *Synthesis* **1989**, 1989 (04) 269-272.
- (225) Kröhnke, F.;Schnegelberger, H.;Weis, W. Synthesen von 1-Hydroxy-dehydrochinolizinium-, Oxa- und Aza-dehydrochinoliziniumsalzen *Chem. Ber.* **1964**, 97 (12) 3566-3576.
- (226) Hough, T. L.;Jones, G. Quinolizines. Part XI. Synthesis of some amino-quinolizinium salts *J. Chem. Soc. (C)* **1968**, (0) 1082-1087.
- (227) Alvarez-Builla, J.;Trigo, G. G.;Ezquerro, J.;Fombella, M. E. 2-Methylpyridinium salts as 1,4-dinucleophiles. Quinolizinium salts from the Westphal condensation *J. Heterocycl. Chem.* **1985**, 22 (3) 681-685.
- (228) Ezquerro, J.;Alvarez-Builla, J. 2-Methylpyridinium salts as 1,4-dinucleophiles. II. Westphal condensation with substituted pyridinium substrates *J. Heterocycl. Chem.* **1986**, 23 (4) 1151-1157.
- (229) Fourmigué, M.;Boubekur, K.;Batail, P.;Bechgaard, K. Azonia Derivatives of Arenes: Synthesis and Properties of 10c-Azoniofluoranthene *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28 (5) 588-590.
- (230) Fourmigué, M.;Eggert, H.;Bechgaard, K. Synthesis and correlation of electronic structures and NMR properties of 10c-azoniofluoranthene and 12d-azoniaperylene *J. Org. Chem.* **1991**, 56 (16) 4858-4864.
- (231) Potts, K. T.;Mattingly, G. S. Synthesis of sempervirine *J. Org. Chem.* **1968**, 33 (10) 3985-3987.
- (232) Prasad, K. B.;Swan, G. A. 411. The constitution of yohimbine and related alkaloids. Part X. The synthesis of some 12H-indolo[2 : 3-a]pyridocolinium salts, including flavocoryline and flavopereirine *J. Chem. Soc.* **1958**, (0) 2024-2038.
- (233) Galera, C.;Vaquero, J. J.;Navio, J. L. G.;Alvarez-Builla, J. 2-Methylthiazolium salts as 1,4-dinucleophiles. Thiazolo[3,2-a]pyridinium salts from Westphal condensation *J. Heterocycl. Chem.* **1986**, 23 (6) 1889-1892.
- (234) Baranova, N. V.;Sheinkman, A. K.;Kost, A. N. Reactions of cyclammonium cations *Chem. Heterocycl. Compd.* **1973**, 9 (9) 1148-1151.
- (235) Hajós, G.;Riedl, Z.;Gács-Baitz, E.;András, M. Selective ring closure to substituted pyrido[1,2-b]-as-triazinium salt *Tetrahedron* **1992**, 48 (39) 8459-8464.
- (236) Costin, C. R. Quinolizinium anion exchange resins and monomers and methods for making them (1977)

- (237) Carceller, R.;L. García-Navío, J.;L. Izquierdo, M.;Alvarez-Builla, J.;Fajardo, M.;Gómez-Sal, P.;Gago, F. Azinium-N-(2'-aziny)aminides: synthesis, structure and reactivity *Tetrahedron* **1994**, *50* (17) 4995-5012.
- (238) Benito M, E. (2004). Síntesis de Nuevos Agentes Intercalante de ADN Derivados de B-carbolina. *Departamento de Química Orgánica*. Alcalá de Henares Universidad de Alcalá.
- (239) Santiesteban, I.;Siro, J. G.;Vaquero, J. J.;Garcia-Navio, J. L.;Alvarez-Builla, J.;Castano, O.;Andres, J. L. Synthesis of Fused Perimidinium Derivatives and Investigation of Their Structure by ab Initio Calculations *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (17) 5667-5672.
- (240) Pereira, M. d. F.;Thiéry, V. One-Pot Synthesis of Pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline Derivatives via Iron-Promoted Aryl Nitro Reduction and Aerobic Oxidation of Alcohols *Org. Lett.* **2012**, *14* (18) 4754-4757.
- (241) Xu, Z.;Singh, N. J.;Kim, S. K.;Spring, D. R.;Kim, K. S.;Yoon, J. Induction-Driven Stabilization of the Anion- π Interaction in Electron-Rich Aromatics as the Key to Fluoride Inclusion in Imidazolium-Cage Receptors *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (4) 1163-1170.
- (242) Mendiola, J.;Rincón, J. A.;Mateos, C.;Soriano, J. F.;de Frutos, Ó.;Niemeier, J. K.;Davis, E. M. Preparation, Use, and Safety of O-Mesitylenesulfonylhydroxylamine *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13* (2) 263-267.
- (243) Granzhan, A.;Ihmels, H. Synthesis of 9-amino- and 9-sulfanyl-substituted benzo[*b*]quinolizinium derivatives *Arkivoc* **2007**, *8* 136-149.
- (244) Tian, M.;Ihmels, H. Synthesis of Fluorescent 9-Aryl-Substituted Benzo[*b*]quinolizinium Derivatives *Synthesis* **2009**, *2009* (24) 4226-4234.
- (245) Takemura, N.;Kuninobu, Y.;Kanai, M. Copper-catalyzed benzylic C(sp³)-H alkoxylation of heterocyclic compounds *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (16) 2528-2532.
- (246) Leonard, K. A.;Barbay, K.;Edwards, J. P.;Kreutter, K. D.;Kummer, D. A.;Maharroof, U.;Nishimura, R.;Urbanski, M.;Venkatesan, H.;Wang, A.;Wolin, R. L.;Woods, C. R.;Fourie, A.;XUE, X. Heteroaryl linked quinoliny modulators of ROR γ t (2012) WO2014062655A1
- (247) Estrada, L. A.;Neckers, D. C. Synthesis and Photophysics of Dibenz[*a,c*]phenazine Derivatives *Org. Lett.* **2011**, *13* (13) 3304-3307.
- (248) Prostota, Y.;Kachkovsky, O. D.;Reis, L. V.;Santos, P. F. New unsymmetrical squaraine dyes derived from imidazo[1,5-*a*]pyridine *Dyes Pigm.* **2013**, *96* (2) 554-562.
- (249) Bosch, P.;Sucunza, D.;Mendicuti, F.;Domingo, A.;Vaquero, J. J. Dibenzopyridoimidazocinnolinium cations: a new family of light-up fluorescent DNA probes *Org. Chem. Front.* **2018**, *5* (12) 1916-1927.
- (250) Duncan, K. W.;Chesworth, R.;Boriack-Sjodin, P. A.;Munchhof, M. J.;Jin, L. Tetrahydro- and dihydro-isoquinoline PRMT5 inhibitors and uses thereof (2014) WO 2014100695 A1 20140626
- (251) Brouwer Albert, M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report) *Pure and Applied Chemistry* **2011**, *83* (12) 2213.
- (252) Seidel, C. A. M.;Schulz, A.;Sauer, M. H. M. Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (13) 5541-5553.

- (253) Ihmels, H.;Faulhaber, K.;Wissel, K.;Bringmann, G.;Messer, K.;Viola, G.;Vedaldi, D. Synthesis and Investigation of the DNA-Binding and DNA-Photodamaging Properties of Indolo[2,3-*b*]quinolizinium Bromide *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2001 (6) 1157-1161.
- (254) Torimura, M.;Kurata, S.;Yamada, K.;Yokomaku, T.;Kamagata, Y.;Kanagawa, T.;Kurane, R. Fluorescence-Quenching Phenomenon by Photoinduced Electron Transfer between a Fluorescent Dye and a Nucleotide Base *Anal. Sci.* **2001**, 17 (1) 155-160.
- (255) Karidi, K.;Garoufis, A.;Hadjiliadis, N.;Reedijk, J. Solid-phase synthesis, characterization and DNA binding properties of the first chloro(polypyridyl)ruthenium conjugated peptide complex *Dalton Trans.* **2005**, (4) 728-734.
- (256) Nordén, B.;Kurucsev, T. Analysing DNA complexes by circular and linear dichroism *J. Mol. Recognit.* **1994**, 7 (2) 141-155.
- (257) Kypr, J.;Kejnovská, I.;Renčuk, D.;Vorlíčková, M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37 (6) 1713-1725.
- (258) Triantafillidi, K.;Karidi, K.;Novakova, O.;Malina, J.;Garoufis, A. DNA binding selectivity of oligopyridine-ruthenium(ii)-lysine conjugate *Dalton Trans.* **2011**, 40 (2) 472-483.
- (259) Dehkordi, M. N.;Bordbar, A.-K.;Lincoln, P.;Mirkhani, V. Spectroscopic study on the interaction of ct-DNA with manganese Salen complex containing triphenyl phosphonium groups *Spectrochim. Acta Part A* **2012**, 90 50-54.
- (260) Basili, S.;Bergen, A.;Dall'Acqua, F.;Faccio, A.;Granzhan, A.;Ihmels, H.;Moro, S.;Viola, G. Relationship between the Structure and the DNA Binding Properties of Diazoniapolycyclic Duplex- and Triplex-DNA Binders: Efficiency, Selectivity, and Binding Mode *Biochemistry* **2007**, 46 (44) 12721-12736.
- (261) Tian, M.;Ihmels, H.;Ye, S. Fluorimetric detection of Mg²⁺ and DNA with 9-(alkoxyphenyl)benzo[*b*]quinolizinium derivatives *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10 (15) 3010-3018.
- (262) Zhang, S.;Zhu, Y.;Tu, C.;Wei, H.;Yang, Z.;Lin, L.;Ding, J.;Zhang, J.;Guo, Z. A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of 1,10-phenanthroline and l-threonine with DNA nuclease activity *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98 (12) 2099-2106.
- (263) Bosch, P.;García, V.;Bilen, B. S.;Sucunza, D.;Domingo, A.;Mendicuti, F.;Vaquero, J. J. Imidazopyridinium cations: A new family of azonia aromatic heterocycles with applications as DNA intercalators *Dyes Pigm.* **2017**, 138 135-146.
- (264) Grela, E.;Kozłowska, J.;Grabowiecka, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review *Acta Histochem.* **2018**, 120 (4) 303-311.
- (265) Andre, J. C.;Vincent, L. M.;O'Connor, D.;Ware, W. R. Applications of fast Fourier transform to deconvolution in single photon counting *J. Phys. Chem.* **1979**, 83 (17) 2285-2294.
- (266) Tripos-International Sybyl-X 2.0. 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
- (267) Clark, M.;Cramer, R. D.;Opdenbosch, N. V. Validation of the general purpose tripos 5.2 force field *J. Comput. Chem.* **1989**, 10 (8) 982-1012.
- (268) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays *J. Immunol. Methods* **1983**, 65 (1) 55-63.

(269) Duncan, K., W.;Chesworth, R.;Munchhof, M., John;JIN, L. PRMT5 inhibitors and uses thereof (2014) PCT/US2013/077151